

1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As lesões de células gigantes (LCG) são processos proliferativos não neoplásicos que se caracterizam histologicamente pela presença de um grande número de células gigantes multinucleadas (CGM) e células mononucleadas (CM), dispersas em um estroma fibroso (FLÓREZ-MORENO *et al.*, 2008). Elas são divididas em lesão central de células gigantes (LCCG) e lesão periférica de células gigantes (LPCG). A LCCG é uma lesão intraóssea proliferativa não neoplásica que ocorre exclusivamente em maxila e mandíbula (BAITANEH; AL-KHATEEB; RAWASHDEB, 2002). A LPCG é considerada uma lesão reacional proliferativa dos tecidos moles da cavidade bucal que se desenvolve a partir de fatores irritantes locais (KATSIKERIS; KAKARANTZA-ANGELOPOULOS; ANGELOPOULOS, 1998). Ambas apresentam características histológicas semelhantes, apesar do comportamento clínico diferente (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; FLÓREZ-MORENO *et al.*, 2008).

A natureza das LCG ainda é controversa e permanece em discussão. As hipóteses variam desde um processo neoplásico a uma lesão com característica reacional (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006a), até um processo vascular proliferativo (COLLINS, 2000; KABAN *et al.*, 2002). Outra situação que, ainda permanece indefinida, é a exata origem das CGM, presentes no estroma dessas lesões. Alguns estudos verificaram a presença da marcação imunoistoquímica para CD68 e CD45, aventando a hipótese de que as CGM podem se originar da linhagem histiócito/macrofágica (DOUSSIS; PUDDLE; ATHANASOU, 1992; LIM; GIBBINS, 1995; O'MALLEY *et al.*, 1997; LIU; YU; LI, 2003; ARAGÃO, 2007). Entretanto, outros estudos verificaram a marcação positiva para a fosfatase ácida târtaro-resistente, sugerindo uma origem da linhagem osteoclástica (TIFEE; AUFDEMORTE, 1997; ITONAGA *et al.*, 2003).

O entendimento exato da patogênese dessas lesões é necessário, uma vez que se tratam de lesões com características histológicas semelhantes e comportamentos clínicos distintos. O estudo molecular das LCCG e LPCG pode elucidar a natureza e a diferença entre ambas as lesões, justificando o comportamento clínico diferenciado e direcionar com maior propriedade o tratamento.

A ácido graxo sintetase (FASN) é uma enzima metabólica responsável pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa, especificamente o palmitato. Essa síntese é produzida a partir dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (BARON *et al.*, 2004; CHIRALA; WAKIL, 2004). Nos tecidos humanos normais, a expressão de FASN é reduzida ou quase nula, uma vez que

os ácidos graxos presentes nesses tecidos são normalmente provenientes da dieta (WEISS *et al.*, 1986; KUHAJDA, 2000; KUHAJDA *et al.*, 2000). Entretanto, em tecidos altamente lipogênicos como o fígado e a mama no período de lactação, essa enzima apresenta elevada expressão (KUHAJDA, 2000; BRINK *et al.*, 2002; CHIRALA *et al.*, 2003). Tem sido observado o aumento da expressão de FASN em carcinoma de mama (PIZER *et al.*, 1996a; MILGRAUM *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2001), ovário (PIZER *et al.*, 1996b; ALÒ *et al.*, 2000) e próstata (DHANASEKARAN *et al.*, 2001; WELSH *et al.*, 2001; SWINNEN *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2003). A presença dessa enzima em tumores de tem sido relacionada com comportamento agressivo e pior prognóstico em tumores de próstata (EPSTEIN; CARMICHAEL; PARTIN, 1995), de mama (ALÓ *et al.*, 1996) e ovário (GANSLER *et al.*, 1997; ALÒ *et al.*, 2000).

Alguns agentes inibidores da FASN têm sido estudados como meio de tratamento de doenças associadas à alta expressividade dessa enzima. Um exemplo é a cerulenina, que é um produto natural do fungo *Cephalosporium caetulens* que atua como inibidor irreversível da atividade de FASN, através de ligação covalente no sítio da β -cetoacil sintetase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (PIZER *et al.*, 1998, GUO *et al.*, 2003). Outro exemplo de inibidor da FASN, com efeito comparável à cerulenina, é a C75, que é uma molécula sintética com cadeia de 7 carbonos (α -metileno- γ -butirolactona). Essa molécula é mais estável que a cerulenina, apresentando melhor efeito “in vitro” (KUHAJDA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001).

Além de inibirem a atividade de FASN, tanto a cerulenina como C75 produzem uma rápida e significativa inibição da replicação do DNA e, conseqüentemente, da progressão da fase S em células derivadas de neoplasias malignas humanas (PIZER *et al.*, 1996; PIZER *et al.*, 1998; KUHAJDA, 2000; LI *et al.*, 2001; DE SCHRIJVER *et al.*, 2003), o que culmina com a morte por apoptose (LI *et al.*, 2001). A forma como a inibição da FASN causa apoptose celular ainda não foi explicada. Relatos de mecanismos como o acúmulo de malonil-CoA após o tratamento com cerulenina ou C75 pode mediar a citotoxicidade resultante da inibição da FASN, através da inibição da oxidação de ácidos graxos (LI *et al.*, 2001; DE SCHRIJVER *et al.*, 2003; KUMAR-SINHA *et al.*, 2003).

CD34 é um marcador de células endoteliais, usado com muita frequência para a verificação da densidade vascular. A imunexpressão de CD34 foi testada em LCG dos maxilares, com o objetivo de comparar a agressividade dessas lesões com a densidade vascular. A densidade vascular foi associada ao comportamento clínico agressivo da LCCG.

Essa conclusão justifica o uso da terapia antiangiogênica (α -2a) nessas lesões (DEWSNUP *et al.*, 2008). Além disso, outro estudo comprovou que as LCG com características agressivas, possuem 16,7 vezes mais chance de ter uma densidade vascular maior que 2,5%, do que lesões não agressivas (SUSARLA *et al.*, 2009).

CD105 é conhecida como uma *endoglin*, um receptor de TGF β sinalizador, que exerce um importante papel na angiogênese e na fibrinogênese. CD105 é mais expressa em vasos neoformados e menos expressa nos preexistentes. Esse imunomarcador foi utilizado para determinar se existe diferença entre a neoformação vascular entre lesões benignas e malignas das glândulas salivares (CARDOSO *et al.*, 2009), e em tumores cerebrais (SICA *et al.*, 2001). Em ambos os estudos, a neoangiogênese estava associada à maior chance de apresentar metástase e ao menor tempo de sobrevida do paciente.

Podoplanin é uma glicoproteína transmembrana que pode ser identificada através de técnicas imunoistoquímicas pela reação *antipodoplanin* (D2-40). Trata-se de um marcador endotelial de vasos linfáticos, que tem sido utilizado em estudos de carcinomas de próstata iniciais, através de biópsia aspirativa (KURODA *et al.*, 2010). Esse marcador foi utilizado também, para comparar a quantidade de vasos sanguíneos com a quantidade de vasos linfáticos em carcinoma de células escamosas da boca. Os resultados desse estudo mostraram que, a proliferação de vasos linfáticos em carcinomas de células escamosas bucais é mais expressiva na área peritumoral do que na área intratumoral (XUAN *et al.*, 2005). Outra aplicação desse anticorpo foi na verificação da proliferação e arquitetura de vasos endoteliais nas margens de ressecção, de carcinomas de células escamosas bucais, livres de tumor. Foi verificada uma expressão extremamente baixa em células basais, principalmente nas regiões de ressecção das margens do tumor em lábio inferior. Entretanto, uma alta expressividade de D2-40 foi encontrada em regiões das margens do tumor, quando esses tumores estavam associados às lesões hiperplásicas ou displásicas (MARGARITESCU *et al.*, 2010).

Não foram encontrados estudos que verificassem o papel do metabolismo celular regulado pela imunomarcagem de FASN em LCCG e LPCG. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a expressão imunoistoquímica para FASN em LCCG e LPCG, observando o comportamento dessa enzima, nas CGM e CM dessas lesões. Além disso, verificar se essa expressão de FASN tem alguma influência na vascularização, angiogênese e linfangiogênese em LCG, através de reações imunoistoquímicas com os anticorpos CD34, CD105 e D2-40, respectivamente.

2.1 - Implicações Éticas

O presente estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri CEP/UFVJM, tendo parecer APROVADO, registrado sob o número: 042/2011 (ANEXO 1).

2.2 – Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo observacional que consistiu na análise da expressão imunohistoquímica de FASN, CD34, CD105 e D2-40 em espécimes teciduais de LCCG e LPCG.

2.3 – Amostra

Foram selecionados, de maneira aleatória, 14 de LCCG e 14 de LPCG, existentes no laboratório de Patologia Bucal da FOP/UNICAMP. Os dados referentes ao gênero, idade, localização e tamanho da lesão foram coletados e anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A).

Critérios de Inclusão:

- amostras teciduais que apresentavam quantidade suficiente de tecido para realização de cortes histológicos;
- descrição clínica adequada;
- descrição radiográfica adequada.

Critérios de Exclusão:

- casos com descrição clínica inadequada;
- patologias associadas como: tumor marrom do hiperparatireoidismo;
- casos em que algum tratamento foi realizado antes do envio do espécime tecidual para análise histopatológica.
- casos que não atenderam aos critérios de inclusão;
- o não funcionamento das reações imunohistoquímicas.

Do total de 28 casos selecionados, um foi excluído, pois as reações imunohistoquímicas não funcionaram para qualquer anticorpo, sugerindo que havia problema com o tecido selecionado. Assim, restaram 13 amostras para LCCG e 14 amostras de LPCG.

2.4 - Estudo imunoistoquímico

2.4.1 – Protocolo imunoistoquímico

Todos os espécimes selecionados foram submetidos a cinco cortes histológicos de 3µm de espessura. No primeiro corte foi realizada a técnica de coloração em H&E, para confirmação do diagnóstico e, os demais cortes, foram submetidos à reação imunoistoquímica para FASN, CD34, CD105 e D2-40. Os cortes foram posicionados em lâminas de vidro silanizadas e submetidos à técnica da imunoperoxidase, pelo método da streptavidina-biotina (LSAB), utilizando os anticorpos e as respectivas recuperações antigênicas descritas na Tabela 1.

Para todas as reações imunoistoquímicas realizadas, foi utilizado um controle imunoistoquímico positivo (Tabela 1). Como controle imunoistoquímico negativo foi realizada a reação sem a utilização do anticorpo primário, para verificar a possibilidade de existência de diagnóstico falso-positivo.

A técnica imunoistoquímica foi realizada da seguinte maneira:

1 – Desparafinização: dois banhos em xilol, inicialmente em estufa, as amostras teciduais foram mergulhadas em xilol, onde permaneceram por 30 minutos a 60° C, em seguida, receberam outro banho de xilol, por 15 minutos, em temperatura ambiente (TA).

2 – Reidratação: realizada com etanol em concentrações decrescentes:

100% - quatro trocas de cinco em cinco minutos em TA;

90% - cinco minutos em TA;

70% - cinco minutos em TA.

Em seguida, foi realizada a imersão em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, por 30 minutos, em TA.

3 – Recuperação antigênica para os anticorpos CD34, CD105, D2-40 e FASN, de acordo com o descrito na Tabela 1.

4 - Após a recuperação, as lâminas foram lavadas em solução de PBS, por três vezes, e expostas ao anticorpo secundário, utilizando o kit LSAB+ (Dako, Carpinteria, USA).

5 - A revelação da reação foi realizada através do uso de tetrahydrocloridrato de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) sólida, diluída em tampão TRIS-HCL pH= 7,4 em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10%, por 3 minutos.

6 - Lavagem dos cortes em um banho de TRIS-HCL pH = 7,4, seguidos de banhos com água destilada. A contra coloração foi realizada através de solução de hematoxilina de Carazzi, por cinco minutos.

7 - Lavagem em solução aquosa de hidróxido de amônio e cinco banhos de água destilada.

8 – Desidratação: solução com concentrações crescentes de etanol:

- 80% por dois minutos em TA;
- 95% por dois minutos em TA;
- 100% três trocas, a cada cinco minutos.

9 – Diafanização em dois banhos de xilol: xilol 1 (dois minutos) e xilol 2 (dois minutos)

10 - Montagem com lamínulas de vidro.

2.4.2 – Análise imunoistoquímica

A avaliação microscópica foi realizada por apenas um observador, previamente treinado, que não tinha conhecimento de qual tipo de lesão (LPCG ou LCCG) estava sendo analisada. Após as reações imunoistoquímicas, todas as lâminas foram escaneadas em um scanner (*Aperio ScanScope, Aperio Technologies, Vista, Califórnia, USA®*). A leitura das lâminas foi realizada utilizando o software do próprio scanner.

Após a verificação da qualidade do escaneamento, através da visualização com o programa (*Aperio*), foram selecionados cinco campos da lâmina para cada marcador imunoistoquímico utilizado, em um aumento de 100X. Para o anticorpo FASN, foram selecionadas as áreas com maior quantidade de células gigantes. Após a seleção das áreas, foram realizadas cinco fotografias dos campos em um aumento de 400X, para cada lâmina. Para avaliação da vascularização as lâminas de CD34, CD105 e D2-40, também foram avaliadas, primeiramente em um aumento de 100X e, em seguida, fotografadas em um aumento de 400X. Foi selecionada para a fotografia dos cinco campos, a área de maior densidade vascular (*Hot Spot*), para o marcador CD34. Os marcadores CD105 e D2-40 foram fotografados na mesma área, ou na área correspondente à que foi feita para o anticorpo CD34.

Para a avaliação da quantidade de CGM e CM marcadas positivamente para a FASN, foi utilizado o programa *Image J.®*. Foram consideradas CGM positivas aquelas que tinham mais de um núcleo e apresentavam o citoplasma com coloração acastanhada. Foram consideradas CGM negativas aquelas que tinham mais de um núcleo e apresentavam o citoplasma sem coloração acastanhada. O mesmo critério de positividade foi adotado para as células que apresentavam somente um núcleo sendo classificadas como CM (Figura 1). Nos cinco campos fotografados para cada lâmina das LCCG e LPCG, todas as CGM e CM positivas e negativas foram contabilizadas. Em seguida, foi realizada a média do número total para cada tipo celular, entre os cinco campos analisados, obtendo-se uma média total de CGM e CM em cada lâmina analisada. Sequencialmente, foi realizado o cálculo da porcentagem de CGM e CM positivas para FASN (APÊNDICE B). Para obter a porcentagem de células

positivas por campo, foi realizada uma regra de três simples, em que se dividiu o número de células positivas (P) pelo número total de células (T) e multiplicou-se por 100. Além da análise da quantidade de células positivas, foi também considerada a intensidade da marcação por FASN, segundo metodologia utilizada por ANDRADE *et al.* (2011). Essa intensidade de marcação foi avaliada subjetivamente e graduada com escores de 0 a 3 (negativa: 0; baixa: 1; moderada: 2; e forte: 3).

A análise dos vasos sanguíneos pela marcação do anticorpo CD34, dos vasos neoformados pela marcação do anticorpo CD105 e dos vasos linfáticos pela marcação do anticorpo D2-40, foi também realizada com o auxílio do programa *Image J*.[®] Foram realizadas as análises da densidade microvascular (DMV) e área microvascular (AMV). A DMV foi definida como o número de vasos marcados, dividido pelo total da área do campo analisado. É importante ressaltar que a área total da imagem foi a mesma para todas os campos ($185600 \mu\text{m}^2$). Foram considerados vasos positivos para CD34, CD105 e D2-40 todos aqueles em que se observou pelo menos uma célula endotelial positiva de coloração acastanhada, com presença ou não de lúmen. A MDV foi calculada para todos os cinco campos em cada lâmina para os marcadores CD34, CD105 e D2-40. Após a aferição da MDV em cada campo, foi realizada uma média da DMV do total dos campos obtendo-se uma DMV final para cada lâmina e seu respectivo marcador. Para a realização da análise estatística da DMV, a área total dos cinco campos ($928000 \mu\text{m}^2$) foi transformada em mm^2 com o resultado de ($0,928 \text{mm}^2$), assim, o número total dos vasos foi dividido por 0,928, obtendo-se a DMV em vasos/ mm^2 .

A AMV foi definida como a área dos vasos marcados por campo. Após a aferição da AMV pelo programa *Image J*.[®] em cada campo, foi realizada a soma da AMV nos cinco campos fotografados para cada lâmina. Em seguida, a soma da AMV nos cinco campos foi dividida pela soma da área total dos 5 campos ($928000 \mu\text{m}^2$), obtendo-se ao final a razão entre a AMV e área total dos campos. A mensuração da AMV foi realizada por traçado do contorno externo do vaso, através do programa *Image J*.[®], que aferiu automaticamente a área dos vasos. O valor foi transferido para o *Software Microsoft Excel*.

2.4.3- Análise Estatística

Os dados foram coletados e digitados em um banco de dados do programa *Microsoft Excel*. Após o cálculo da DMV e da razão entre a AMV total e área da imagem total, os dados foram transferidos para um banco de dados do programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*), versão 17.0. Primeiramente, foi realizada uma análise descritiva dos dados. Em

seguida, as variáveis contínuas foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, pois a amostra continha um número menor que 20 lesões para cada grupo. Para a comparação da DMV, AMV (CD34, CD105 e D2-40), da porcentagem e quantidade total de CGM e CM entre os grupos de lesões, foram utilizados os testes, teste “t” para amostras independentes para as variáveis com distribuição normal e Mann-Whitney para as variáveis que não obtiveram uma distribuição normal. Além disso, foram realizados testes de correlação de Pearson e Spearman para as variáveis contínuas citadas acima e o teste do Qui-quadrado para associar a intensidade de marcação por FASN com o tamanho das lesões. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.5–Hipóteses

Foram aventados seis pares de hipóteses para o presente estudo:

H₁

H_{1,0}: Não há diferenças entre a DMV para os anticorpos CD34, CD105 e D2-40 entre os grupos de lesões.

H_{1,1}: Há diferenças entre a DMV para os anticorpos CD34, CD105 e D2-40 entre os grupos de lesões.

H₂

H_{2,0}: Não há diferenças entre a AMV para os anticorpos CD34, CD105 e D2-40 entre os grupos de lesões.

H_{2,1}: Há diferenças entre a AMV para os anticorpos CD34, CD105 e D2-40 entre os grupos de lesões.

H₃

H_{3,0}: Não há diferenças entre a porcentagem de CGM e CM positivas para FASN por campo fotografado entre os grupos de lesões.

H_{3,1}: Há diferenças entre a porcentagem de CGM e CM positivas para FASN por campo fotografado entre os grupos de lesões.

H₄

H_{4,0}: Não existe correlação entre o número total de CGM e CM com a DMV e AMV em CD34, CD105 e D2-40.

H_{4,1}: Existe correlação entre o número total de CGM e CM com a DMV e AMV em CD34, CD105 e D2-40.

H₅

H_{5,0}: Não existe correlação entre a porcentagem de CGM e CM positivas para FASN com a DMV e AMV em CD34, CD105 e D2-40.

H_{5,1}: Existe correlação entre a porcentagem de CGM e CM positivas para FASN com a DMV e AMV em CD34, CD105 e D2-40.

H6

H_{6,0}: Não existe associação entre a intensidade de marcação de FASN e o tamanho das lesões de células gigantes.

H_{6,1}: Existe associação entre a intensidade de marcação de FASN e o tamanho das lesões de células gigantes.

Título: Imunoexpressão de FASN e angiogênese em Lesões Centrais e Periféricas de Células Gigantes.

Título curto: FASN e angiogênese em lesão de célula gigante.

Palavras-chave: lesões de células gigantes, imunoistoquímica, angiogênese, enzima ácido graxo sintetase.

Saulo Gabriel Moreira Falci¹, Ana Terezinha Marques Mesquita¹, Felipe Paiva Fonseca², Bruno Augusto Benevenuto de Andrade², João Luiz de Miranda¹, Oslei Paes de Almeida², Cássio Roberto Rocha dos Santos¹

¹Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

²Setor de Patologia Oral do Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Endereço para Correspondência:

Saulo Gabriel Moreira Falci

Rua Tiradentes 195C, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

CEP: 39100-000

Tel /Fax: +55 38 – 8817 1454

email: sulofalci@hotmail.com

3.1 – RESUMO

Objetivo: Avaliar a expressão de FASN e o grau de angiogênese entre LCCG e LPCG, além de verificar a correlação entre essas variáveis. **Métodos:** Foram selecionados 13 casos de LCCG e 14 casos de LPCG para análise da expressão imunoistoquímica de FASN, CD34, CD105 e D2-40. A expressão de FASN foi avaliada nos componentes celulares da lesão, seguida da mensuração da densidade microvascular (DMV) e área microvascular (AMV) para cada uma das amostras selecionadas. Os dados coletados foram submetidos à análise descritiva e sequencialmente aos testes de Mann Whitney, teste *t* para amostras independentes, teste do qui-quadrado de Pearson e testes de correlação de Pearson e Spearman. **Resultados:** Não houve diferença na imunoexpressão de FASN entre os grupos de lesões (CM/FASN+ $p = 0,320$) e (CGM/FASN+ $p = 0,815$). As LPCG apresentaram maior DMV em CD34 ($p = 0,002$); não houve diferença na DMV em CD105 ($p = 0,296$) e D2-40 ($p = 0,092$) entre as lesões. A AMV em LPCG foi maior que em LCCG para CD34 ($p = 0,001$), CD105 ($p = 0,041$) e D2-40 ($p = 0,036$). Houve correlação positiva entre (CM/FASN+ com DMV/CD105) em LPCG. Além disso, em LCCG, foi observada correlação positiva entre (CM/FASN+ com DMV/CD105), (CM/FASN+ com AMV/CD105 e CD34), (CGM/FASN+ com AMV/CD105). **Conclusões:** Os níveis similares da imunoexpressão de FASN e angiogênese indicam processos constitutivos da manutenção tissular de ambas as lesões. No entanto, as diferenças na vascularização, entre os grupos de lesões, parecem estar influenciadas por CM positivas para FASN.

3.2 - INTRODUÇÃO

As lesões de células gigantes (LCG) dos maxilares são processos proliferativos não neoplásicos, divididos em Lesão Central de Célula Gigante (LCCG) e Lesão Periférica de Célula Gigante (LPCG) (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007). A LPCG é reacional, estando associada a fatores irritantes locais que ocorrem na gengiva e mucosa alveolar (HERNANDEZ *et al.*, 2009). A LCCG é intraóssea, com etiologia desconhecida (NICOLAI *et al.*, 2010). Histologicamente semelhantes, as LCCG e LPCG, são caracterizadas pela presença de um estroma rico em células mononucleares (CM), onde se observa, também, uma grande quantidade de células gigantes multinucleares (CGM) e vasos sanguíneos adjacentes (LIU; YU; LI, 2007; KAUZMAN *et al.*, 2004). Embora histologicamente semelhantes, as LCCG e LPCG podem apresentar comportamentos clínicos diferentes (GIBBINS, 1995; SOUZA; MESQUITA; GOMES, 2000; LIM; CARVALHO *et al.*, 2009).

A ácido graxo sintetase (FASN) é a enzima metabólica responsável pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa, especificamente o palmitato. Essa síntese é realizada a partir dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (BARON *et al.*, 2004; CHIRALA; WAKIL, 2004). Na maioria dos tecidos humanos normais a atividade da enzima FASN é baixa, uma vez que esses tecidos utilizam os ácidos graxos provenientes da dieta (WEISS *et al.*, 1986; KUHAJDA, 2000; KUHAJDA *et al.*, 2000). Ao contrário, as neoplasias malignas como carcinomas de mama (PIZER *et al.*, 1996), ovário (ALÒ *et al.*, 2000) e próstata (ROSSI *et al.*, 2003) apresentam alta atividade de FASN. Recentemente, foi verificada também, alta expressividade de FASN em neoplasias malignas da boca (DA SILVA *et al.*, 2009; DE ANDRADE *et al.*, 2011). Entretanto, a expressão imunoistoquímica de FASN nunca foi avaliada em processos proliferativos não neoplásicos e em neoplasias benignas da boca.

Estudos da expressão imunoistoquímica de CD34, glicoproteína constantemente encontrada no endotélio vascular, têm sido realizados para comparar o comportamento clínico de LPCG e LCCG. Esses estudos mostraram que LCCG agressivas possuem maior densidade microvascular (DMV) (DEWSNUP *et al.*, 2008; SUSARLA *et al.*, 2009). No entanto, CD34 não é capaz de distinguir entre vasos pré-existentes e neoformados. Estudos recentes indicam que a identificação de vasos neoformados é relevante e com implicações prognósticas importantes (CARDOSO *et al.*, 2009). CD105 (*endoglin*) é um marcador de angiogênese, devido à sua expressão específica em vasos neoformados (CHEIFETZ *et al.*, 1992). Entretanto, em LCG não existem estudos que verificam a expressão de vasos neoformados, até o presente momento. Outro ponto relevante e, ainda, não esclarecido é a caracterização da

vascularização linfática em LCG, a qual pode ser estudada através da reação imunoistoquímica utilizando o anticorpo *anti-podoplanin* (D2-40) (KAHN; MARKS, 2002). Como exemplo, Xuan *et al.* (2005) utilizaram D2-40 para avaliar a vascularização linfática em carcinoma de células escamosas da boca.

Estudos avaliando a vascularização em LCCG e LPCG têm sido realizados (GIBBINS, 1995; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006; DEWSNUP *et al.*, 2008; SUSARLA *et al.*, 2009; LIM; MATOS *et al.*, 2011;). Além disso, tem sido relatado que o aumento da expressão de FASN e angiogênese está diretamente relacionado com a tumorigênese. Entretanto, se esses eventos estão envolvidos na patogênese das LCCG e LPCG, ainda é desconhecido. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de FASN e o grau de angiogênese entre LCCG e LPCG, além de verificar a correlação entre essas variáveis.

3.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética e pesquisa da instituição em que foi realizada (Número: 042/2011). Neste estudo, foram utilizados 13 LCCG e 14 LPCG selecionados aleatoriamente dos arquivos do laboratório de patologia bucal. Os blocos de parafina selecionados foram submetidos a novos cortes histológicos e corados com H&E, sendo o diagnóstico de LCCG ou LPCG confirmado por dois patologistas. Os critérios de exclusão da amostra foram: descrição clínica inadequada, patologias associadas (cisto ósseo aneurismático, tumor marrom do hiperparatireoidismo e querubismo) e quantidade insuficiente de material para a realização de cortes histológicos. O material utilizado correspondeu à primeira biópsia da lesão e nenhum tratamento foi realizado anteriormente à remoção do tecido para análise.

Para cada anticorpo utilizado (FASN, CD34, CD105 e D2-40) foram realizados cortes histológicos seriados de 3 µm de espessura. Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol, inicialmente em estufa (30 min, a 60° C), em seguida, em temperatura ambiente, por 15 min. A reidratação foi realizada com etanol, em concentrações decrescentes (100%, 90% e 70%). Posteriormente, os cortes histológicos foram imersos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, por 30 min, em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados, diluições e recuperação antigênica são mostrados na Tabela 1.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução de PBS, por três vezes, e expostas ao anticorpo secundário, utilizando o kit LSAB+ (Dako, Carpinteria, USA). A revelação da reação foi realizada através do uso do cromógeno diamino benzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) sólida, diluída em tampão TRIS-HCL pH= 7,4, em peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) a 10%, por 3 min. Em seguida, foi realizada a lavagem dos cortes em banho de TRIS-HCL em $pH = 7,4$, seguido de dois banhos com água destilada. A contracoloração foi realizada através de solução de hematoxilina de Carazzi, por 5 min, seguida de lavagem em solução aquosa de hidróxido de amônio e cinco banhos de água destilada. Posteriormente, os cortes foram desidratados em solução com concentrações decrescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados com lamínulas de vidro.

A análise imunoistoquímica foi realizada sem o conhecimento do diagnóstico final da lesão. As lâminas foram escaneadas e os campos fotografados com auxílio do *hardware Aperio ScanScope* (Aperio Technologies, Vista, California, USA). Para a análise da imunexpressão de FASN em LCCG e LPCG foram selecionadas as áreas com maior quantidade de células gigantes em aumento de 100X. Em seguida, cinco campos foram fotografados em aumento de 400X. A seleção dos campos para avaliação da densidade microvascular (DMV) e da área microvascular (AMV) foi realizada nas áreas de maior densidade vascular (*hot spot*) para o anticorpo CD34. Após a seleção dos campos em aumento de 100X, foram realizadas fotografias em aumento de 400X, com o tamanho final das imagens de ($580 \times 320 \mu m / 185600 \mu m^2$) para cada anticorpo, semelhante ao estudo realizado por Lima *et al.* (2011). Um total de cinco campos foram fotografados para cada imunomarcador em todas as lesões. As fotografias dos imunomarcadores CD105 e D2-40 foram realizadas com a mesma metodologia e, na região correspondente ou quase correspondente, à do CD34.

Através do *software Image J.®* (Scion Corporation, USA) as CM e CGM foram contadas, nas LCCG e LPCG. Os fibroblastos presentes foram identificados pela morfologia celular e excluídos da contagem. Para cada campo, foram contados o número total de CGM e CM e determinada a porcentagem de CM e CGM positivas para FASN. Em seguida foi calculada a média da porcentagem das CM e CGM positivas para FASN em cada caso. A intensidade da imunomarcação para FASN foi realizada de acordo com De Andrade *et al.* (2011), graduada de 0 a 3 (0: negativa, 1: baixa, 2: moderada e 3: forte) e associada ao tamanho das lesões.

A densidade microvascular DMV foi definida como o número de vasos marcados por campo (área de imagem de $185600 \mu m^2$) e foi calculada para os imunomarcadores CD34, CD105 e D2-40. Sequencialmente, para obter a DMV final, considerou-se a média da DMV dos cinco campos avaliados. Para a realização da análise estatística da DMV, a área total dos cinco campos, $928000 \mu m^2$, foi transformada em mm^2 com o resultado de $0.928 mm^2$; assim, o número total dos vasos foi dividido por 0.928. A área microvascular AMV foi definida

como a área dos vasos marcados positivamente por campo e foi calculada para os mesmos imunomarcadores. A soma da AMV em μm^2 dos cinco campos foi dividida pela soma da área total da imagem dos cinco campos ($928000 \mu\text{m}^2$), obtendo-se, ao final, a razão entre a AMV e a área total dos campos. A mensuração da área dos vasos foi realizada por traçado no contorno externo vascular, sobre a imagem, através do programa Image J.® (Fig. 1). Após traçado o contorno vascular, o programa mediu automaticamente a área (μm^2) e a quantidade de vasos existentes por campo. Essas medidas foram transferidas para o *software Microsoft Excel*. Tanto para a mensuração da DMV quanto para a AMV, uma célula endotelial, ou um conjunto de células endoteliais positivas com ou sem lúmen, foram consideradas para a avaliação.

Os dados coletados foram digitados e organizados em um banco de dados do programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*), versão 17.0. Primeiramente, foi realizada uma análise descritiva dos dados. Em seguida, as variáveis contínuas foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a comparação da DMV, AMV, porcentagem de CGM e CM positivas e quantidade total de CGM e CM entre os grupos de lesões, foram utilizados o teste *t* para amostras independentes, para as variáveis com distribuição normal, e teste de *Mann-Whitney* para as variáveis que não obtiveram uma distribuição normal. Além disso, foram realizados testes de correlação de Pearson e Spearman, para as variáveis contínuas citadas acima, e o teste do Qui-quadrado, para associar a intensidade de marcação para FASN e o tamanho das lesões. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.4 – RESULTADOS

A média de CM, CGM entre os grupos de lesões, porcentagem de CM/FASN+ e CGM/FASN+ (Fig. 2), assim como as médias da DMV e AMV para CD34, CD105 e D2-40 (Fig. 2) em LPCG e LCCG, estão sumarizadas na Tabela 2. Os resultados do presente estudo indicam que não há diferenças entre a expressão imunoistoquímica de FASN, em CM ($p = 0,320$) e CGM ($p = 0,815$) entre LPCG e LCCG (Tabela 3). As LPCG possuem maior DMV em CD34 ($p = 0,002$). Entretanto, não houve diferenças na DMV em CD105 ($p = 0,296$) e D2-40 ($p = 0,092$) entre as lesões. A AMV em LPCG foi maior do que em LCCG para CD34 ($p = 0,001$), CD105 ($p = 0,041$) e D2-40 ($p = 0,036$), (Tabela 3). Os testes de correlação entre CM, CGM, CM/FASN+, CGM/FASN+ com DMV e AMV, que apresentaram significância, estão dispostos na Tabela 4. Não houve associação entre a intensidade de marcação para FASN e o tamanho das LPCG e LCCG (Tabela 5).

3.5 – DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o número total de CM e CGM e observou um maior número destas células em LPCG. Floréz-Moreno *et al.* (2008) relataram que o número, tamanho e forma das CGM variou em cada lesão e entre as lesões. Em estudo prévio, foi observada maior taxa de Ki-67 nas CM em LPCG (SOUZA *et al.*, 2000), o que pode explicar o maior número de CM em LPCG existentes nesse estudo. Assim, considerando a hipótese de que as CGM se originam da fusão das CM (HAQUE; MOATASIM, 2008), é natural que haja, também, um maior número de CGM nas LPCG, como encontrado no presente estudo. Por outro lado, em estudo recente, foi observado um maior índice de apoptose em CGM nas LPCG, sugerindo que a atividade apoptótica pode estar relacionada com o comportamento clínico das lesões (AMARAL *et al.*, 2011)

Não foram encontrados estudos que verificassem a expressão imunoistoquímica de FASN em lesões benignas e processos proliferativos não neoplásicos da boca. Portanto, a presente pesquisa é o primeiro estudo que avalia a expressão de FASN em LCG. A alta expressão de FASN tem sido observada em neoplasias malignas da boca e associada à proliferação celular nesses tumores (DA SILVA *et al.*, 2009; DE ANDRADE, *et al.*, 2011). Apesar do estudo de Souza *et al.* (2000) mostrar maior proliferação celular de CM, pela imunomarcagem de Ki-67, em LPCG do que em LCCG, no presente estudo não foi encontrada diferença significativa na porcentagem de CM/FASN+ e CGM/FASN+, entre esses grupos de lesões. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas entre a intensidade de marcação para FASN e o tamanho das lesões. Esse resultado sugere que a FASN participa do processo constitutivo dessas lesões e tem o papel de manutenção da homeostase local em ambas as lesões.

A DMV em LCG foi estudada através da imunoexpressão de CD34 (DEWSNUP *et al.*, 2008; SUSARLA *et al.*, 2009), fator de Von Willebrand (MATOS *et al.*, 2011) e VEGF (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006). O estudo com o CD34 evidenciou maior DMV entre LCCG agressivas. Outro estudo utilizando o VEGF comparou a DMV das LCCG com áreas de inflamação e, sugeriu que as LCCG não podem ser consideradas lesões vasculares proliferativas. No presente estudo foi observada maior DMV entre as LPCG, quando comparadas com as LCCG, corroborando o estudo de Matos *et al.* (2011), que atribuíram esse resultado à natureza reacional das LPCG. Além de maior DMV ($p = 0,002$), foi também, observada maior AMV ($p = 0,001$) entre as LPCG para CD34, representando um dado novo na literatura. A causa dessa diferença entre as lesões pode ser o maior número de células como os mastócitos, influenciando a angiogênese, durante o desenvolvimento das lesões e, isso deve ser investigado entre LCCG e LPCG.

Apesar das diferenças significativas da DMV de CD34 entre as lesões, no presente estudo não foram encontradas diferenças na DMV de CD105 ($p=0,296$) e D2-40 ($p=0,092$), entre os grupos de lesões. Isso significa que, a angiogênese e a linfangiogênese comportam-se de maneira semelhante em LCCG e LPCG, e não devem ser relacionadas à natureza reativa das LPCG. Embora esse estudo não tenha comparado a DMV de CD105 entre LCCG agressivas e não agressivas, a terapia anti-angiogênica em LCCG (DEWSNUP *et al.*, 2008; DE LANGE *et al.*, 2009; RACHMIEL *et al.*, 2011) deve ser vista com cuidado, considerando os resultados do presente trabalho. Com relação à vascularização linfática, no presente trabalho foi constatada uma reduzida presença desses vasos em LCCG e LPCG, sugerindo que eles já estavam presentes antes do desenvolvimento das lesões. Todavia, foi observada maior AMV em LPCG ($p = 0.036$) e, também, correlação negativa entre o número de CGM e a MDV para vasos linfáticos em LPCG, o que é difícil explicar devido à inexistência de estudos que avaliaram a linfangiogênese em LCG. O anticorpo D2-40 também foi identificado em germes dentários, odontoblastos, polpa dentária e camada basal do epitélio de lesões odontogênicas (ZUSTIN; SCHEUER; FRIEDRICH, 2010). A partir dessa observação, sugeriu-se que essa glicoproteína participa dos processos de desenvolvimento normal das estruturas dentárias e dos processos patológicos em lesões odontogênicas. Curiosamente, em nosso estudo, foi observada marcação de D2-40 nas células do estroma fibroso em seis casos de LPCG e em dois LCCG, mesmo se tratando de uma lesão não odontogênica.

Por outro lado, a AMV em CD105 ($p = 0,041$) apresentou diferença significativa entre os grupos de lesões, em que as LPCG apresentaram maior AMV. Existem alguns fatores que devem ser considerados quando comparamos a AMV entre LCG. Um deles é a localização anatômica dessas lesões. A LCCG por ser intraóssea (NICOLAI *et al.*, 2010) pode dificultar a expansão da área vascular por pressão interna. Nas LCCG ocorre também, o processo de osteoclastogênese mediado pela expressão de MMP-9 e VEGF nas CM (MATOS *et al.*, 2011). Nesse estudo foi encontrada maior expressão de MMP-9 e VEGF em LCCG e maior DMV em LPCG. Isto pode ser explicado pelo fato de que a pré-existência de outras células como os mastócitos em LPCG, que podem influenciar no perfil vascular dessas lesões (LIMA *et al.*, 2011). A pré-existência destas células também pode justificar a maior AMV em LPCG encontrada no presente trabalho.

O Orlistat, medicamento antiobesidade, inibiu a síntese de ácidos graxos, através do bloqueio do domínio tioesterase da ácido graxo sintetase (FASN) e, conseqüentemente, causou a inibição da proliferação das células endoteliais em modelo *ex vivo*. Assim, a FASN foi considerada como participante ativa da neoangiogênese (BROWNE *et al.*, 2006). No

presente estudo foram observadas correlações entre a AMV dos vasos neoformados com a porcentagem CGM/FASN+ ($r = 0.614$; $p = 0.026$) e a porcentagem CM/FASN+ ($r = 0.758$; $p = 0.003$) em LCCG. Também, foi constatada correlação positiva entre a AMV dos vasos que expressaram CD34 e a porcentagem CM/FASN+ ($r=0.553$; $p=0.050$) em LCCG. Ainda, vale a pena ressaltar que a correlação entre CM/FASN+ e a DMV de vasos neoformados apresentou um valor de $p=0,079$ e um $r=0,5$ em LPCG e LCCG. Considerando os resultados do estudo de Browne *et al.* (2006), podemos sugerir que as CM/FASN+ participaram da proliferação do endotélio vascular dos vasos neoformados, ampliando a luz desses vasos, principalmente em LCCG. Não obstante, para que a manutenção do metabolismo tecidual seja garantida, a expressão imunistoquímica de FASN pode estar associada, como em um mecanismo de *feedback*, à AMV e DMV, principalmente dos vasos neoformados.

Esse foi o primeiro estudo que avaliou a expressão imunistoquímica de FASN, CD105 e D2-40 em LPCG e LCCG. Os resultados mostraram que os níveis similares da expressão imunistoquímica de FASN e angiogênese indicam processos constitutivos da manutenção tissular de ambas as lesões. No entanto, as diferenças nas características vasculares, como a AMV dos vasos neoformados em LCCG, entre os grupos de lesões, parecem estar correlacionadas com CM positivas para FASN.

AGRADECIMENTOS: À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado. Ao Prof. Dr. Jorge Esquiche León pela importante contribuição nesse estudo. Ao Victor Toral Rizo, pelo treinamento na metodologia aplicada. À Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela realização das reações imunistoquímicas.

CONFLITOS DE INTERESSE: Não existem conflitos de interesse nesse trabalho.

3.6 – REFERÊNCIAS

1. ALÒ, P.L. *et al.* Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. **Oncol Rep.**, v.7, n.6, p.1383-1388, 2000.
2. AMARAL, F.R. *et al.* Quantitative expression analysis of apoptotic/antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. **Tumour Biol.**, v.32, n.5, p.997-1003, 2011.
3. BARON, A. *et al.* Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? **J. Cell Biochem.**, v.91, n.1, p.47-53, 2004.
4. BROWNE, C.D.; HINDMARSH, E.J.; SMITH, J.W. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. **FASEB. J.**, v.20, n.12, p.2027-2035, 2006.
5. CARDOSO, S.V. *et al.* Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. **BMC. Cancer**, v.9, p.391-8, 2009.
6. CARVALHO, V.M. *et al.* Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. **Oral Dis.**, v.15, n.1, p.106–110, 2009.
7. CHEIFETZ, S. *et al.* Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.27, p. 19027-19030, 1992.
8. CHIRALA, S.S.; WAKIL, S.J. Structure and function of animal fatty acid synthase. **Lipids**, v.39, n.11, p.1045-1053, 2004.
9. DA SILVA, S.D. *et al.* Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v.45, n.10, p.134-139, 2009.
10. DE ANDRADE, B.A. *et al.* Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. **Oral Dis.**, v.17, n.8, p.808-812, 2011.
11. DE LANGE, J. *et al.* Regression of central giant cell granuloma by a combination of imatinib and interferon: a case report. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.47, n.1, p.59-61, 2009.
12. DE LANGE, J.; VAN DEN AKKER, H.P.; VAN DEN BERG, H. Central giant cell granuloma of the jaw: a review of the literature with emphasis on therapy options. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.104, n.5, p.603-615, 2007.
13. DEWSNUP, N.C. *et al.* Immunohistochemical evaluation of giant cell tumors of the jaws using CD34 density analysis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.66, n.5, p.928-933, 2008.
14. FLÓREZ-MORENO, G.A. *et al.* Cytomorphometric and immunohistochemical comparison between central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 105, n.5, p.625-632, 2008.
15. HAQUE, A.U.; MOATASIM, A. Giant cell tumor of bone: a neoplasm or a reactive condition? **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v.1, n.6, p.489-501, 2008.
16. HERNANDEZ, G. *et al.* Clinical outcomes of peri-implant peripheral giant cell granuloma: a report of three cases. **J. Periodontol.**, v.80, n.7, p.1184-1191, 2009.
17. KAHN, H.J.; MARKS, A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. **Lab. Invest.**, v.82, n.9, p.1255-1257, 2002.
18. KAUZMAN, A. Central giant cell granuloma of the jaws: assessment of cell cycle proteins. **J. Oral Pathol. Med.**, v.33, n.3, p.170-176, 2004.

19. KUHAJDA, F.P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. **Nutrition**, v.16, n.3, p.202-208, 2000.
20. KUHAJDA, F.P. *et al.* Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, n.7, p.3450-3454, 2000.
21. LIM, L.; GIBBINS, J.R. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of a modified microvasculature in the giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.79, n.2, p.190–198, 1995.
22. LIMA, S.C. *et al.* Immunohistochemical Evaluation of Angiogenesis and Tryptase-positive Mast Cell Infiltration in Periapical Lesions. **J. Endod.**, v.37, n.12, p.1642 – 1646, 2011.
23. LIU, B.; YU, S.F.; LI, T.J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **J. Oral Pathol. Med.**, v.32, n.6, p.367-375, 2003.
24. MATOS, F.R. *et al.* Immunoexpression of MMP-9, VEGF, and vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **J. Oral Pathol. Med.**, v.40, n.4 p.338-344, 2011.
25. NICOLAI, G. *et al.* Central giant cell granuloma of the jaws. **J. Craniofac. Surg.**, v.21, n.2, p.383-386, 2010.
26. PIZER, E.S. *et al.* Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. **Cancer Res.**, v.56, n.12, p.2745-2747, 1996.
27. RACHMIEL, A. *et al.* Combined treatment of aggressive central giant cell granuloma in the lower jaw. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, May, 2011.
28. ROSSI, S. *et al.* Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. **Mol. Cancer Res.**, v.1, n.10, p.707-715, 2003.
29. SOUZA, P.E.; MESQUITA, R.A.; GOMEZ, R.S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Dis.**, v.6, n.1 35–39, 2000.
30. SUSARLA, S.M. *et al.* CD34 staining density predicts giant cell tumor clinical behavior. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.67, n.5, p.951-956, 2009.
31. VERED, M.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Giant cell granuloma of the jawbones – a proliferative vascular lesion? Immunohistochemical study with vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. **J. Oral Pathol. Med.**, v.35, n.10, p.613-9, 2006.
32. XUAN, M. *et al.* Immunohistochemical co-localization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v.34, n.6, p.334-339, 2005.
33. WEISS, L. *et al.* Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v.367, n.9, p.905-912, 1986.
34. ZUSTIN, J.; SCHEUER, H.A.; FRIEDRICH, R.E. Podoplanin expression in human tooth germ tissues and cystic odontogenic lesions: an immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.**, v.39, n.1, p.115-120, 2010.

3.7 – TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de recuperação antigênica

Anticorpos	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica
FASN	23/610962 (monoclonal)	BD Transduction Laboratories	1:200	Tampão TRIS/EDTA (pH 9,0)
CD34	QBEnd10	Dako	1:50	Tampão de ácido cítrico (pH 6,0)
CD105	SN6h	Dako	1:4000	Proteinase K
D2-40	D2-40	Dako	1:100	Tampão de ácido cítrico (pH 6,0)

Tabela 2 – Médias da imunomarcção para FASN em CM e CGM e médias da DMV e AMV em LCCG e LPCG.

	LPCG		LCCG	
CGM	8,6 (5 – 11)		5,9 (1 – 10)	
CGM/FASN+	39% (8 – 86%)		36% (0 – 84%)	
CM	187 (127 – 236)		148 (103 – 204)	
CM/FASN+	7% (2 – 19%)		10% (0 – 26%)	
	DMV	AMV	DMV	AMV
CD34	$\frac{139}{(62 - 217)}$ vasos/mm ²	$\frac{0,06}{(0,04 - 0,1)}$	$\frac{90}{(20 - 135)}$ vasos/mm ²	$\frac{0,03}{(0,01 - 0,06)}$
CD105	$\frac{43}{(0 - 125)}$ vasos/mm ²	$\frac{0,03}{(0 - 0,08)}$	$\frac{90}{(0 - 85)}$ vasos/mm ²	$\frac{0,01}{(0 - 0,06)}$
D2-40	$\frac{19}{(0 - 44)}$ vasos/mm ²	$\frac{0,01}{(0 - 0,03)}$	$\frac{8}{(0 - 30)}$ vasos/mm ²	$\frac{0,002}{(0 - 0,01)}$

Tabela 3 – Comparação entre os grupos de lesões de células gigantes com relação à DMV, AMV, total CGM e CM por campo, e porcentagem de CGM e CM imunopositivas para FASN.

Variável	N	Média	DP	Mediana	(25th)	(75th)	T	U	p
DMV CD34 (LPCG)	14	139,85	43,53	151,39	92,66	166,48	3,454	*	0,002 ^t
DMV CD34 (LCCG)	13	90,42	28,67	85,12	78,66	113,68			
DMV CD105 (LPCG)	14	43,63	34,29	37,71	15,35	71,92	1,067	*	0,296 ^t
DMV CD105 (LCCG)	13	30,66	28,30	23,70	5,92	52,79			
DMV D2-40 (LPCG)	14	19,23	16,64	14,54	4,30	40,13	*	56,5	0,092 ^m
DMV D2-40 (LCCG)	13	8,62	9,41	6,58	0	14,54			
AMV CD34 (LPCG)	14	0,059	0,017	0,052	0,048	0,071	*	21,0	0,001 ^m
AMV CD34 (LCCG)	13	0,030	0,016	0,026	0,020	0,038			
AMV CD105 (LPCG)	14	0,034	0,023	0,040	0,007	0,048	*	49,0	0,041 ^m
AMV CD105 (LCCG)	13	0,016	0,017	0,009	0,003	0,024			
AMV D2-40 (LPCG)	14	0,010	0,012	0,004	0,001	0,024	*	48,5	0,036 ^m
AMV D2-40 (LCCG)	13	0,002	0,003	0,001	0	0,002			
# CGM p/ campo (LPCG)	14	8,64	1,81	8,70	7,65	9,70	3,102	*	0,005 ^t
# CGM p/ campo (LCCG)	13	5,95	2,63	6,00	3,80	7,70			
% CGM/FASN + (LPCG)	14	39,14	27,98	34,60	12,25	69,02	0,641	*	0,815 ^t
% CGM/FASN + (LCCG)	13	36,58	28,20	36,84	15,91	47,72			
# CM p/ campo (LPCG)	14	187,68	29,74	194,10	169,15	208,00	3,186	*	0,004 ^t
# CM p/ campo (LCCG)	13	148,55	34,07	154,20	118,50	182,00			
% CM/FASN + (LPCG)	14	7,86	4,64	6,50	4,27	10,00	-1,015	*	0,320 ^t
% CM/FASN + (LCCG)	13	10,28	9,10	7,51	5,00	14,90			

t: teste t para amostras independentes; m: teste de Mann-Whitney; #: número total.

Tabela 4 – Correlação entre a imunomarcação de FASN em CM e CGM com a DMV e AMV em LCCG e LPCG.

Comparação	n	r	p
Células Gigantes Multinucleadas			
LPCG			
# CGM x MDV (D2-40)	14	-0,572	0,032 ^P
LCCG			
# CGM x MDV (CD34)	13	0,549	0,052 ^P
# CGM x AMV (CD105)	13	0,613	0,026 ^S
CGM /FASN+ x AMV (CD105)	13	0,614	0,026 ^S
Células Mononucleadas			
LPCG			
CM/FASN+ x MDV (CD105)	14	0,485	0,079 ^P
LCCG			
CM/FASN+ x MDV (CD105)	13	0,504	0,079 ^S
CM FASN+ x AMV (CD34)	13	0,553	0,050 ^S
CM FASN+ x AMV (CD105)	13	0,758	0,003 ^S

P: teste de correlação de Pearson; S: teste de correlação de Spearman; # número total.

Tabela 5 – Associação entre o tamanho das LPCG e LCCG com a intensidade de imunomarcção por FASN.

	LPCG		<i>p</i>	LCCG		<i>p</i>
	0,8 a 1,5 cm n (%)	2,0 a 5,0 cm n (%)		0,7 a 4,0 cm n (%)	5.0 a 13.0 cm n (%)	
Intensidade de marcação para FASN						
negativa/fraca	4(57,1)	3(42,9)	0,704	4(44,4)	5(55,6)	0,657
moderada/forte	3(42,9)	4(57,1)		2(50,0)	2(50,0)	
Teste Pearson's Chi-square						

3.8 – FIGURAS

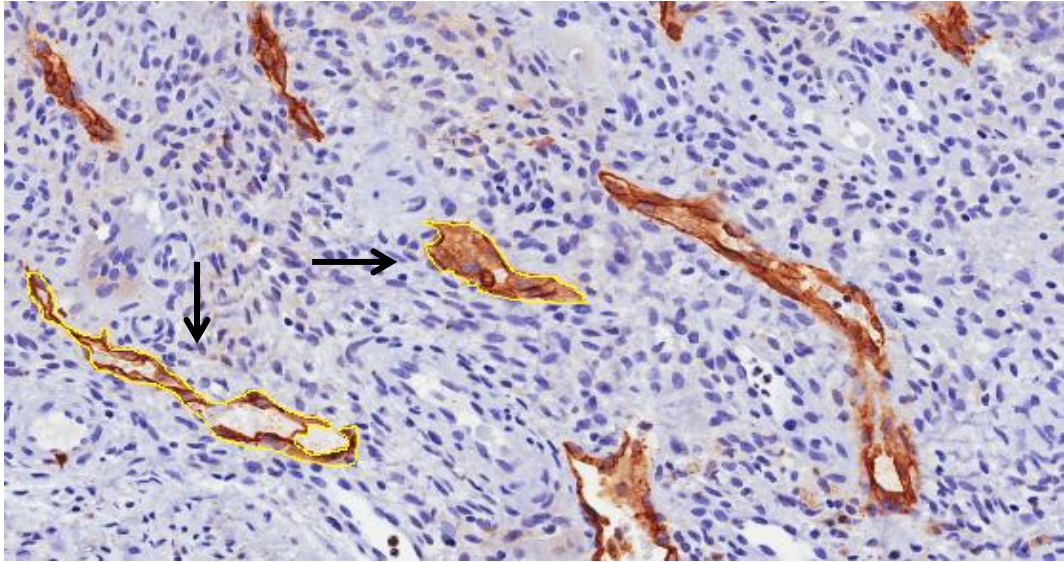
Figura 1

Figura 1. Método utilizado para mensuração da MDV e AMV dos vasos. Observar o contorno amarelo realizado em dois vasos (setas pretas), um vaso contendo lúmen e o outro aparentemente sem lúmen.

Figura 2

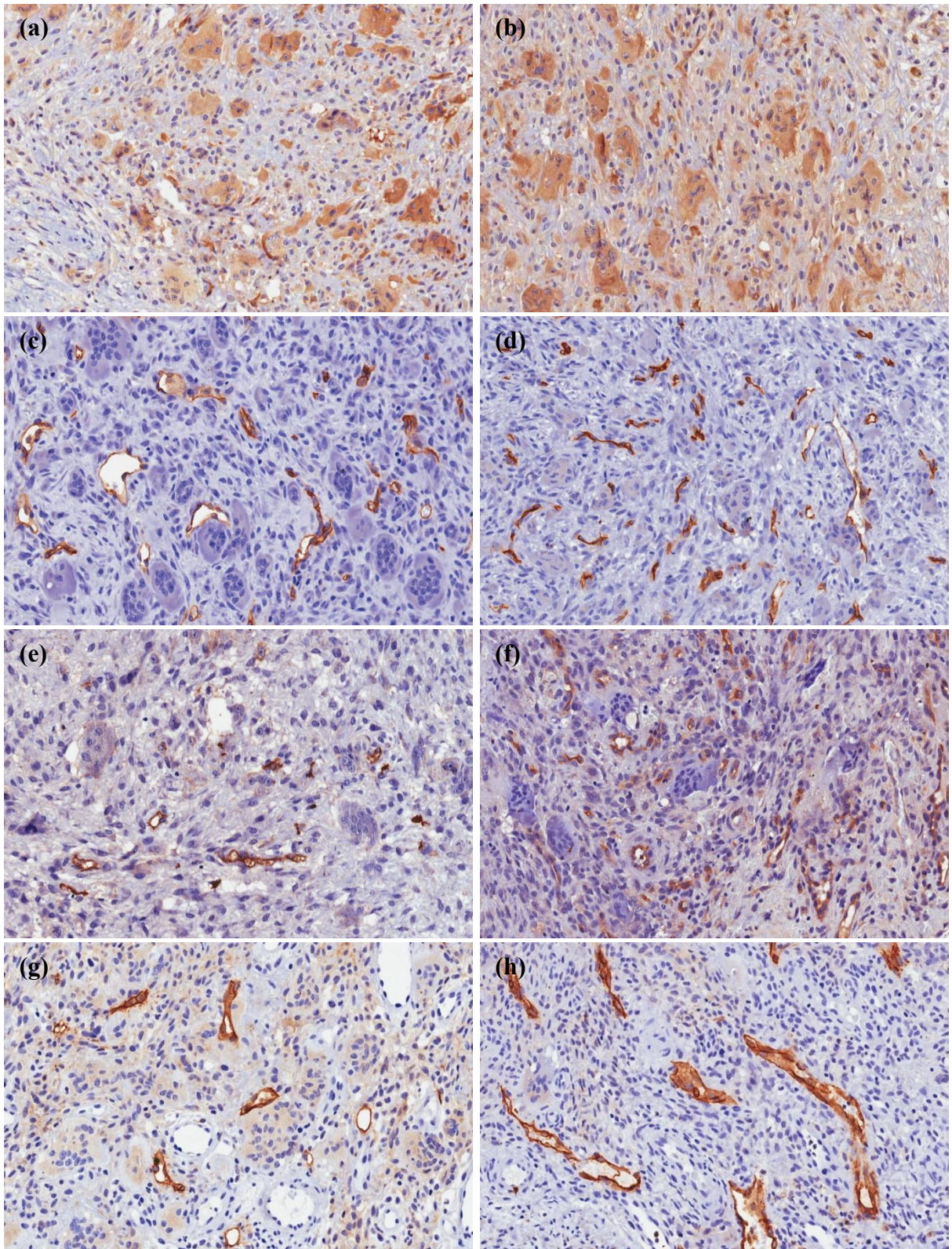


Figura 2. Expressão de FASN, CD34, CD105 e D2-40 em LPCG e LCCG: **(a)** Expressão de FASN em LCCG mostrando CM e CGM positivas e negativas; **(b)** Expressão de FASN em LPCG mostrando CM e CGM positivas e negativas; **(c)** Expressão de CD34 nas células endoteliais de coloração amarronzada em LCCG; **(d)** Expressão de CD34 nas células endoteliais de coloração amarronzada em LPCG; **(e)** Expressão de CD105 endoglin, coloração amarronzada, nas células vasculares endoteliais de vasos neoformados em LCCG; **(f)** Expressão de CD105 endoglin, coloração amarronzada, nas células vasculares endoteliais de vasos neoformados em LPCG; **(g)** Expressão de D2-40 nas células endoteliais dos vasos linfáticos, com coloração amarronzada, em LCCG; **(h)** Expressão de D2-40 nas células endoteliais dos vasos linfáticos, com coloração amarronzada, em LPCG. (Aumento de 400X **a-h**).

3.9 – LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Método utilizado para mensuração da MDV e AMV dos vasos. Observar o contorno amarelo realizado em dois vasos (setas vermelhas), um vaso contendo lúmen e o outro aparentemente sem lúmen.

Figura 2. Expressão de FASN, CD34, CD105 e D2-40 em LPCG e LCCG: **(a)** Expressão de FASN em LCCG, mostrando CM e CGM positivas e negativas; **(b)** Expressão de FASN em LPCG, mostrando CM e CGM positivas e negativas; **(c)** Expressão de CD34 nas células endoteliais, de coloração amarronzada, em LCCG; **(d)** Expressão de CD34 nas células endoteliais, de coloração amarronzada, em LPCG; **(e)** Expressão de CD105 endoglin, coloração amarronzada, nas células vasculares endoteliais de vasos neoformados em LCCG; **(f)** Expressão de CD105 endoglin, coloração amarronzada, nas células vasculares endoteliais de vasos neoformados em LPCG; **(g)** Expressão de D2-40 nas células endoteliais dos vasos linfáticos, com coloração amarronzada, em LCCG; **(h)** Expressão de D2-40 nas células endoteliais dos vasos linfáticos, com coloração amarronzada, em LPCG. (Aumento de 400X **a-h**).

4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações Finais

A LPCG e LCCG são duas lesões distintas clinicamente, mas com características histológicas semelhantes (FLÓREZ-MORENO *et al.*, 2008). Estudos estão sendo realizados para tentar compreender a natureza das CGM e CM e como essas células atuam no desenvolvimento da lesão, assim como o comportamento vascular dessas lesões. Alguns autores consideraram que as LCG não são lesões vasculares proliferativas (VERED *et al.*, 2006b; DWESNUP *et al.*, 2008; SUSARLA *et al.*, 2009). Entretanto, esse é o primeiro estudo que avaliou a angiogênese e linfangiogênese nestas lesões. Também, o presente estudo foi o primeiro que avaliou a expressão da FASN em LCG, considerando a hipótese de que o índice metabólico regulado por essa enzima nas CGM e CM pode ter alguma influência no perfil vascular dessas lesões.

D2-40 é um anticorpo extremamente seletivo para vasos linfáticos. Entretanto, um estudo realizado em germes dentários, dentes adultos e lesões odontogênicas, foram observadas marcações na maioria das células epiteliais e ectomesenquimais dos tecidos dos germes dentários, odontoblastos e fibroblastos superficiais da polpa dentária e na camada basal do epitélio dos cistos odontogênicos (ZUSTIN; SCHEUER; FRIEDRICH, 2010). A partir dessa observação, sugeriu-se que essa glicoproteína participa dos processos de desenvolvimento normal das estruturas dentárias e dos processos patológicos em lesões odontogênicas. Curiosamente, no presente estudo, foi observada marcação de D2-40 nas células do estroma fibroso em oito casos de LCG, seis em LPCG e dois em LCCG, mesmo não se tratando de lesões odontogênicas. Além disso, a camada basal do tecido epitelial nas lesões presentes estava corada. Margaritesco *et al.* (2010) relacionou a expressão de D2-40 na camada basal do epitélio como um evento precoce ao desenvolvimento de tumores; além da presença dessa glicoproteína estar relacionada a um maior índice de recidiva, quando presente na amostras teciduais de ressecções livres de tumores. Assim, acreditamos que estudos associando a taxa de recidiva em LCCG e a expressão de D2-40 na camada basal do epitélio devam ser realizados.

A partir dos resultados do presente estudo, podemos concluir que os níveis similares da expressão imunoistoquímica de FASN e angiogênese indicam processos constitutivos da manutenção tissular de ambas as lesões. No entanto, as diferenças nas características vasculares, como a AMV dos vasos neoformados em LCCG, entre os grupos de lesões, parecem estar correlacionadas com CM positivas para FASN.

5.0 REFERÊNCIAS GERAIS

1. ALÒ, P.L. *et al.* Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. **Oncol Rep.**, v.7, n.6, p.1383-1388, 2000.
2. ALÒ, P.L. *et al.* Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. **Cancer**, v.77, n.3, p.474-482, 1996.
3. AMARAL, F.R. *et al.* Quantitative expression analysis of apoptotic/antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. **Tumour Biol.**, v.32, n.5, p.997-1003, 2011.
4. ARAGÃO, M.D.S. *et al.* Central giant cell granuloma of the jaws and giant cell tumor of long bones: an immunohistochemical comparative study. **J. Appl. Oral Sci.**, v.15, n.4, p.310-316, 2007.
5. BARON, A. *et al.* Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? **J. Cell Biochem.**, v.91, n.1, p.47-53, 2004.
6. BATAINEH, A.B.; AL-KHATEEB, T.; RAWASHDEB, M.A. The surgical treatment of central giant cell granuloma of the mandible. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.60, n.7, p.756-761, 2002.
7. BRINK, J. *et al.* Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.99, n.1, p.138-143, 2002.
8. BROWNE, C.D.; HINDMARSH, E.J.; SMITH, J.W. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. **FASEB. J.**, v.20, n.12, p.2027-2035, 2006.
9. CARDOSO, S.V. *et al.* Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. **BMC. Cancer**, v.9, p.391-398, 2009.
10. CARLILE, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumor progression and field concretization. **J. Oral Pathol. Med.**, v.30, n.8, p.449-457, 2001.
11. CARVALHO, V.M. *et al.* Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. **Oral Dis.**, v.15, n.1, p.106-110, 2009.
12. CHEIFETZ, S. *et al.* Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. **J. Biol Chem.**, v.267, n.27, p. 19027-19030, 1992.
13. CHIRALA, S.S. *et al.* Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.100, n.11, p.6358-6363, 2003.
14. CHIRALA, S.S.; WAKIL, S.J. Structure and function of animal fatty acid synthase. **Lipids**, v.39, n.11, p.1045-1053, 2004.
15. CHOUNG, R. *et al.* Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.44, n.9, p.708-713, 1986.
16. COLLINS, A. Experience with anti-angiogenic therapy of giant cell granuloma of the facial bones. **Ann. R. Australian Coll. Dent. Surg.**, v.15, p.170-175, 2000.
17. DA SILVA, S.D. *et al.* Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v.45, n.10, p.134-139, 2009.
18. DE ANDRADE, B.A. *et al.* Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. **Oral Dis.**, v.17, n.8, p.808-812, 2011.

19. DE LANGE, J. *et al.* Regression of central giant cell granuloma by a combination of imatinib and interferon: a case report. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.47, n.1, p.59-61, 2009.
20. DE LANGE, J.; VAN DEN AKKER, H.P.; VAN DEN BERG, H. Central giant cell granuloma of the jaw: a review of the literature with emphasis on therapy options. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 2007; v.104, n.5, p.603-615, 2007.
21. DE SCHRIJVER, E. *et al.* RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. **Cancer. Res.**, v.63, n.13, p.3799-3804, 2003.
22. DEWSNUP, N.C. *et al.* Immunohistochemical evaluation of giant cell tumors of the jaws using CD34 density analysis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.66, n.5, p.928-933, 2008.
23. DHANASEKARAN, S.M. *et al.* Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. **Nature**, v.412, n.6849, p822-826, 2001.
24. DOUSSIS, I.A.; PUDDLE, B.; ATHANASOU, N.A. Immunophenotype of multinucleated and mononuclear cells in giant cell lesions of bone and soft tissue. **J. Clin. Pathol.**, v.45, n.5, p398-404, 1992.
25. EPSTEIN, J. I.; CARMICHAEL, M.; PARTIN, A. W. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. **Urology.**, v.45. n.1, p.81-86, 1995.
26. FLÓREZ-MORENO, G.A. *et al.* Cytomorphometric and immunohistochemical comparison between central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 105, n.5, p.625-632, 2008.
27. GANSLER, T.S. *et al.* Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. **Hum. Pathol.**, v.28, n.6, p.686-692, 1997.
28. GUO, C.B. *et al.* Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.61, n.8, p.909-912, 2003.
29. HAQUE, A.U.; MOATASIM, A. Giant cell tumor of bone: a neoplasm or a reactive condition? **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v.1, n.6, p.489-501, 2008.
30. HERNANDEZ, G. *et al.* Clinical outcomes of peri-implant peripheral giant cell granuloma: a report of three cases. **J. Periodontol.**, v.80, n.7, p.1184-1191, 2009.
31. ITONAGA, I. *et al.* Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. **J. Oral Pathol. Med.**, v.32, n.4, p.224-231, 2003.
32. KABAN, L.B. *et al.* Antiangiogenic therapy with interferon alpha for giant cell lesions of the jaws. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.60, n.10, p.1103-1111, 2002.
33. KAHN, H.J.; MARKS, A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. **Lab Invest.**, v.82, n.9, p.1255-1257, 2002.
34. KATSIKERIS, N.; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU, E.; ANGELOPOULOS, A.P. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.17, n.2, p.94-97, 1998.
35. KAUZMAN, A. Central giant cell granuloma of the jaws: assessment of cell cycle proteins. **J. Oral Pathol. Med.**, v.33, n.3, p.170-176, 2004.
36. KUHAJDA, F.P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. **Nutrition**, v.16, n.3, p.202-208, 2000.
37. KUHAJDA, F.P. *et al.* Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.97, n.7, p.3450-3454, 2000.

38. KUMAR-SINHA, C. *et al.* Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. **Cancer Res.**, v.63, n.1, p.132-139, 2003.
39. KURODA, N. *et al.* Immunohistochemical application of D2-40 as basal cell marker in evaluating atypical small acinar proliferation of initial routine prostatic needle biopsy materials. **Med. Mol. Morphol.**, v.43, n.3, p.165-169, 2010.
40. LI, J.N. *et al.* Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. **Cancer Res.**, v.61, n.4, p.1493-1499, 2001.
41. LIM, L.; GIBBINS, J.R. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of a modified microvasculature in the giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.79, n.2, p.190-198, 1995.
42. LIMA, S.C. *et al.* Immunohistochemical Evaluation of Angiogenesis and Tryptase-positive Mast Cell Infiltration in Periapical Lesions. **J. Endod.**, v.37, n.12, p.1642 – 1646, 2011.
43. LIU, B.; YU, S.F.; LI, T.J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **J. Oral Pathol. Med.**, v.32, n.6, p.367-375, 2003.
44. MATOS, F.R. *et al.* Immunoexpression of MMP-9, VEGF, and vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **J. Oral Pathol. Med.**, v.40, n.4 p.338-344, 2011.
45. MĂRGĂRITESCU, C. *et al.* Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical and fractal analysis study. **Histol. Histopathol.**, v.25, n.6, p.701-711, 2010.
46. MILGRAUM, L.Z. *et al.* Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v.3, n.11, p.2115-2120, 1997.
47. NICOLAI, G. *et al.* Central giant cell granuloma of the jaws. **J. Craniofac. Surg.**, v.21, n.2, p.383-386, 2010.
48. O'MALLEY, M. *et al.* Central giant cell granulomas of the jaws: phenotype and proliferation-associated markers. **J. Oral Pathol. Med.**, v.26, n.4, p.159-163, 1997.
49. PIZER, E. S. *et al.* Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. **Cancer Res.**, v.58, n.20, p.4611-4615, 1998.
50. PIZER, E.S. *et al.* Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. **Cancer Res.**, v.56, n.12, p.2745-2747, 1996a.
51. PIZER, E.S. *et al.* Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. **Cancer Res.**, v.56, n.6, p.1189-1193, 1996b.
52. RACHMIEL, A. *et al.* Combined treatment of aggressive central giant cell granuloma in the lower jaw. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, May, 2011. [Epub ahead of print]
53. RIVERA, R.S. *et al.* Heparanase and vascular endothelial growth factor expression in the progression of oral mucosal melanoma. **Oncol. Rep.**, v.19, n.3, p.657-661, 2008.
54. ROSSI, S. *et al.* Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. **Mol. Cancer Res.**, v.1, n.10, p.707-715, 2003.
55. SICA, G. *et al.* Assessment of angiogenesis by CD105 and nestin expression in peritumor tissue of glioblastoma. **Int. J. Oncol.**, v.38, n.1, p.41-49, 2011.
56. SOUZA, P.E.; MESQUITA, R.A.; GOMEZ, R.S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Dis.**, v.6, n.1 35-39, 2000.
57. SUSARLA, S.M. *et al.* CD34 staining density predicts giant cell tumor clinical behavior. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.67, n.5, p.951-956, 2009.

58. SWINNEN, J.V. *et al.* Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. **Int. J. Cancer.**, v.98, n.1, p.19-22, 2002.
59. TIFFEE, J.C.; AUFDEMORTE, T.B. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v.55, n.10, p.1108-1112, 1997.
60. VERED, M.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Giant cell granuloma of the jawbones – a proliferative vascular lesion? Immunohistochemical study with vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. **J. Oral Pathol. Med.**, v.35, n.10, p.613-9, 2006a.
61. VERED, M.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Immunohistochemical expression of glucocorticoid and calcitonin receptors as a tool for selecting therapeutic approach in central giant cell granuloma of the jawbones. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.35, n.8, p.756-760, 2006b.
62. XUAN, M. *et al.* Immunohistochemical co-localization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v.34, n.6, p.334-339, 2005.
63. WANG, Y. *et al.* Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. **Cancer Lett.**, v.167, n.1, p.99-104, 2001.
64. WEISS, L. *et al.* Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v.367, n.9, p.905-912, 1986.
65. WELSH, J.B. *et al.* Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. **Cancer Res.**, v.61, n.16, p.5974-5978, 2001.
66. ZUSTIN, J.; SCHEUER, H. A.; FRIEDRICH, R. E. Podoplanin expression in human tooth germ tissues and cystic odontogenic lesions: an immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.**, v.39, n.1, p.115-120, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A
Características Clínicas das LCG

Caso	Gênero	Tamanho Mm	Raça	Idade	Localização anatômica
Lesões centrais de células gigantes					
742/02					
602/02					
1045/02B					
1248/02B					
331/03A					
944/05					
546/06C					
416/06					
1361/08B					
2423/09A					
2822/09					
2212/09					
1064/10A					
Lesões periféricas de células gigantes					
065/01					
925/02					
122/03					
258/04					
290/04					
909/05					
1638/06					
1638/06A					
1140/09					
1283/09					
1573/09					
1778/09					
1500/09					
2402/09					

Apêndice B



Ficha para avaliação de células imunopositivas / total de células

Tipo Celular: () CGM () CM

Marcador: () FASN

Lâmina	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Total P/ T	%
Lesões Periféricas de Células Gigantes							
742/02	/	/	/	/	/	/	
602/02	/	/	/	/	/	/	
1045/02B	/	/	/	/	/	/	
1248/02B	/	/	/	/	/	/	
331/03A	/	/	/	/	/	/	
944/05	/	/	/	/	/	/	
546/06C	/	/	/	/	/	/	
416/06	/	/	/	/	/	/	
1361/08B	/	/	/	/	/	/	
2423/09A	/	/	/	/	/	/	
2822/09	/	/	/	/	/	/	
2212/09	/	/	/	/	/	/	
1064/10A	/	/	/	/	/	/	
742/02	/	/	/	/	/	/	
Lesões Centrais de Células Gigantes							
742/02	/	/	/	/	/	/	
602/02	/	/	/	/	/	/	
1045/02B	/	/	/	/	/	/	
1248/02B	/	/	/	/	/	/	
331/03A	/	/	/	/	/	/	
944/05	/	/	/	/	/	/	
546/06C	/	/	/	/	/	/	
416/06	/	/	/	/	/	/	
1361/08B	/	/	/	/	/	/	
2423/09A	/	/	/	/	/	/	
2822/09	/	/	/	/	/	/	
2212/09	/	/	/	/	/	/	
1064/10A	/	/	/	/	/	/	

ANEXO 1

	Comitê de Ética em Pesquisa	
PARECER CONSUBSTANCIADO		Nº de protocolo no Comitê:
<input checked="" type="checkbox"/> PROJETO DE PESQUISA		042/11
<input type="checkbox"/> TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO		
I - Identificação:		
<input type="checkbox"/> Título do projeto: Estudo comparativo das características imunoistoquímicas das lesões central e periférica de células gigantes <input type="checkbox"/> Pesquisador responsável – Prof. Cássio Roberto Rocha dos Santos (doutorado) <input type="checkbox"/> Instituição onde se realizará: UFVJM/FOP-UNICAMP <input type="checkbox"/> Área temática: Odontologia <input type="checkbox"/> Data de apresentação ao CEP: 30/09/2011. 1ª. resubmissão em 30/09/11 – 2ª. resubmissão 24/010/11		
II - Objetivos:		
Geral: Esta pesquisa tem como objetivo analisar e comparar a expressão de marcadores imunoistoquímicos em 28 casos de lesões de células gigantes (LCG) da cavidade bucal.		
Específicos:		
<ul style="list-style-type: none"> • Determinar e comparar o padrão de marcação imunoistoquímica nas células gigantes multinucleadas e mononucleadas da LCCG e LPCG, através dos marcadores FASN, VEGF, CD105, CD34 e D2-40. • Analisar a angiogênese na LCCG e LPCG através dos marcadores VEGF, CD105 e CD-34 e a linfangiogênese, utilizando o marcador D2-40. • Verificar a existência de correlação entre o padrão de marcação imunoistoquímica de FASN, VEGF, CD105, CD34 e D2-40 e o comportamento clínico da LCCG e LPCG. 		
III- Sumário do projeto:		
<input type="checkbox"/> Descrição e caracterização da amostra: Serão incluídos no estudo 14 casos de LCCG e 14 casos de LPCG diagnosticadas no Laboratório de Histopatologia da FOP/UNICAMP.		
<input type="checkbox"/> Critérios de inclusão e exclusão:		
INCLUSÃO: Serão incluídas na amostra as LCGs que foram diagnosticadas no Laboratório de Histopatologia da FOP/UNICAMP.		
EXCLUSÃO:		
<ol style="list-style-type: none"> I) LCGs que apresentarem quantidade insuficiente de material para a análise imunoistoquímica nos blocos de parafina. II) Prontuários dos pacientes que foram diagnosticados com LCG que não apresentem as características clínicas da lesão. III) Descrição no laudo histopatológico de LCG que não incluem informações quanto ao aspecto macroscópico da lesão, como forma, tamanho, cor e consistência. 		
<input type="checkbox"/> Adequação da metodologia: está adequada.		
<input type="checkbox"/> Adequação das condições: O projeto será desenvolvido no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), cujo responsável pelo setor autorizou a realização do trabalho atestou que o laboratório apresenta infra-estrutura necessária para execução do trabalho.		
IV- Comentários do relator frente à Resolução 196/96/CNS e complementares em particular sobre:		
<input type="checkbox"/> Justificativa do uso do placebo (caso haja): não se aplica		
<input type="checkbox"/> Justificativa da suspensão terapêutica (wash out): não se aplica		
<input type="checkbox"/> Estrutura do protocolo: está adequada.		
<input type="checkbox"/> Análise de riscos e benefícios: está explicitada no projeto.		
<input type="checkbox"/> Adequação do consentimento e forma de obtê-lo: foi apresentada justificativa para dispensar o uso de TCLE, pois é material de arquivo.		
<input type="checkbox"/> Informação adequada quanto ao financiamento: a informação está adequada.		
<input type="checkbox"/> Lista de centros (para estudos multicêntricos): não se aplica.		
<input type="checkbox"/> Outros:		
V – Pendências		
VI- Observações: Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador que deverá também apor sua assinatura na última página do referido termo.		
VII – Motivos da não aprovação		
<p>Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Rodovia MGT 367, Km 583, nº. 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100000 – Diamantina MG – Brasil (38) 3532.1240 – http://www.ufvjm.edu.br/pesquisa/cep.html</p>		

VIII- Parecer Consubstanciado do CEP:

- APROVADO.** Receberá parecer e certificado do Comitê.
- PENDENTE.** Certificado do Comitê sujeito à resolução das pendências em tempo previsto.
- NÃO APROVADO.** Receberá apenas o parecer do CEP. Submeterá novo projeto ao Comitê.

Para projetos aprovados

- 1) Somente estará autorizado o início da pesquisa, após aprovação do protocolo pelo CEP.
- 2) O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- 3) O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- 4) O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- 5) Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- 6) Relatório final deve ser apresentado ao CEP em 01/03/2012. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

IX - Data da reunião do CEP: 08 de novembro de 2011.

Prof.ª Dr.ª Etal Rocha Vieira
Vice-Coordenadora CPE/UFVJM

Prof.ª Agnes Maria Gomes Murta
Prof.ª. Agnes Maria Gomes Murta, Ph.D.
Coordenadora do CEP UFVJM

Prof.ª Dr.ª Agnes Maria Gomes Murta
Coordenadora CPE/UFVJM

ANEXO 2

Normas para a publicação na revista *Oral Diseases*.

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

Relevant Documents: [Copyright Transfer Agreement](#), [Online Open Order Form](#), [Colour Work Agreement Form](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles Published in *Oral Diseases*](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

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

1. GENERAL

The editors encourage submissions of original articles, review articles, reports of meetings, book reviews and correspondence in the form of letters to the editor. *Oral Diseases* does not accept case reports.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Oral Diseases*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Oral Diseases adheres to the ethical guidelines given below for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Oral Diseases adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

As of September 1st 2007, it is a requirement that the corresponding author submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors should also be registered with a correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are incorrect, the corresponding author will be contacted by the Journal Administrator.

Acknowledgements: Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research. Authors must acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials). If/how this assistance was funded should be described and included with other funding information. "Acknowledgements" should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

2.2. Ethical Approvals

Human Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

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

2.3 Clinical Trials

Clinical Trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. Clinical trials can be registered in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. As stated in an editorial published in *Oral Diseases* (12:217-218), 2006), all manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website. The clinical trial registration number and name of the trial register will be published with the paper.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Authors are also required to disclose any possible conflict of interest. These include financial (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee). Information on sources of funding and any potential conflict of interest should be disclosed at submission under the heading "Acknowledgements".

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7 Permissions

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

2.8 Copyright

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and that a substantially similar manuscript is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign all copyright to Wiley-Blackwell, if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes, in electronic databases and the like, or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed).

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

A completed [Copyright Transfer Agreement](#) (CTA) needs to be mailed, email or faxed to the Production Editor at the address below. This needs to be submitted only **upon acceptance**. Please do not submit CTAs at submission.

The CTA should be mailed to:

Wiley-Blackwell
At: Enrico Ventura
Journal Content Management
Wiley Services Singapore Pte Ltd
1 Fusionopolis Walk
#07-01 Solaris South Tower
Singapore 138628
T: +65 6643 8475
F: +65 6643 8008
Email: ODI@wiley.com

For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#)

2.9. Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Oral Diseases only accepts online submission of manuscripts. Manuscripts should be submitted at the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/odi>. Complete instructions for submitting a manuscript are available at the site upon creating an account. Assistance for submitting papers can be sought with the editorial assistant Rosie Ledger at: odiedoffice@wiley.com

Upon successful submission, the journal administrator will check that all parts of the submission have been completed correctly. If any necessary part is missing or if the manuscript does not fulfil the requirements as specified below, the corresponding author will be asked either to adjust the submission according to specified instructions or to submit their paper to another journal.

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/odi>

- Log-in or, if you are a new user click on 'register here'.
- If you are registering as a new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Corresponding Author Centre'.

3.2. Submitting Your Manuscript

After you have logged into your 'Corresponding Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.

- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to register all of your co-authors with a functioning e-mail address. If the e-mail address is incorrect, you will be contacted by the journal administrator.
- You are required to upload your files: Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer. Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button. When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

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

3.4. Blinded Review

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

3.5. Suggest a Reviewer

Oral Diseases attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, you must suggest the names and current e-mail addresses of from 2-4 potential reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript in an unbiased way.

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

The average time from submission to first decision for manuscripts submitted to *Oral Diseases* is 20 days. You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: Manuscripts reporting laboratory investigations, well-designed and controlled clinical research, and analytical epidemiology are invited. Studies related to aetiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment are all of interest, but all papers must be based on rigorous hypothesis-driven research. Areas of interest include autoimmune, endocrine, genetic, infectious, metabolic and mucosal diseases; cancer and pre-cancerous conditions; chemosensory, developmental, geriatric and motor disorders, pain and wound healing.

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

Editorials: These will only be solicited by the editors.

Letters to the Editors: Letters, if of broad interest, are encouraged. They may deal with material in papers published in *Oral Diseases* or they may raise new issues, but should have important implications.

Case Reports: *ORAL DISEASES* DOES NOT ACCEPT CASE REPORTS.

Meeting Reports: Will be considered by the editors for publication only if they are of wide and significant interest.

Book Reviews: These will be solicited by the editors.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 7 published pages are subject to a charge of GBP70 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: Authors should write their manuscripts in British English using an easily readable style. Authors whose native language is not English should have a native English speaker read and correct their manuscript. Spelling and phraseology should conform to standard British usage and should be consistent throughout the paper. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. The background and hypotheses underlying the study as well as its main conclusions should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Technical jargon: should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations: *Oral Diseases* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.3. Structure: All papers submitted to *Oral Diseases* should include:

- Title Page

- Structured Abstract (reviews need not include a structured abstract)
- Main text
- References
- (Figures)
- (Figure Legends)
- (Tables)

Title Page: should be part of the manuscript uploaded for review and include:

- A title of no more than 100 characters including spaces
- A running title of no more than 50 characters
- 3-6 keywords
- Complete names and institutions for each author
- Corresponding author's name, address, email address and fax number
- Date of submission (and revision/resubmission)

Abstract: is limited to 200 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form set out under:

- Objective(s),
- Subject(s) (or Materials) and Methods,
- Results,
- Conclusions(s).

The Main Text of Original Research Articles should be organised as follows

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: As noted above, these should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material. Clinical trials can be registered in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. As stated in an editorial published in *Oral Diseases* (12:217-218), 2006), all manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website. The clinical trial registration number and name of the trial register will be published with the paper.

(ii) Experimental subjects: As noted above, experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

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

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Acknowledgements: Should be used to provide information on sources of funding for the research, any potential conflict of interest and to acknowledge contributors to the study that do not qualify as authors. All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

5.4. References

The journal policy is to encourage references to original papers, not to literature reviews. References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown and Smith, 2005). Three or more authors should always be referred to as, for example, Jones et al., 2005.

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

A list of the references must be given at the end of the paper and should follow the recommendations in *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*, (1975), p.36. London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

last name(s) of all the author(s) and their initials, year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

Name(s) of author(s), year, chapter title, title of book, edition, volume, town of publication, publisher, page number(s).

c) Authors' names should be arranged thus:

Smith AB and Jones DE

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (2005).

e) The title of the paper should be included without quotation marks.

f) The journal title should be abbreviated, should be italicised, and followed by the volume number in bold type and page numbers separated by a dash.

Examples:

Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB, Mehta FS, Pindborg JJ (1995). Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10-year study of 12212 users. *Oral Diseases* **1**: 54-58.

Baum BJ, Voutetakis A, Wang J (2004). Salivary glands: novel target sites for gene therapeutics. *Trends Mol Med.* **10**: 585-590.

Shear M and Speight PM (2007). *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions*. Wiley-Blackwell: Oxford.

Scully C (2004). The oral cavity and lips. In: Burns DA, Breathnach SM, Cox N, Griffiths C, eds., *Rooks Textbook of Dermatology*. 7th Edition. Blackwell Science: Oxford, pp.66.1.-66.121.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Figures: All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF).

Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the Production Editor within **three days** of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

Early View (Publication Prior to Print)

Oral Diseases is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Author Services

Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with [Wiley-Blackwell's Author Services](#).