



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA**

**FABIANNA DA CONCEIÇÃO DANTAS DE MEDEIROS**

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À  
AUTOFAGIA (Atg7, p62 e p-mTOR) EM CERATOCISTOS  
ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2019**

**FABIANNA DA CONCEIÇÃO DANTAS DE MEDEIROS**

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À  
AUTOFAGIA (Atg7, p62 e p-mTOR) EM CERATOCISTOS  
ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN**

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

**Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2019**

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

M488a Medeiros, Fabianna da Conceição Dantas de.  
Análise imunoistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à Síndrome de Gorlin [manuscrito] / Fabianna da Conceição Dantas de Medeiros. - 2019.  
84 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.  
"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Departamento de Odontologia - CCBS."  
1. Síndrome de Gorlin. 2. Autofagia. 3. Cistos odontogênicos. 4. Ceratocistos odontogênicos. I. Título  
21. ed. CDD 617.6

FABIANNA DA CONCEIÇÃO DANTAS DE MEDEIROS

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À  
AUTOFAGIA (Atg7, p62 e p-mTOR) EM CERATOCISTOS  
ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN

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

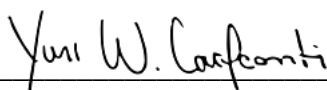
Aprovada em 30/07/2019

BANCA EXAMINADORA



---

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



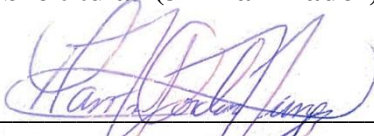
---

Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti/ UFPB  
Membro titular (2º Examinador)



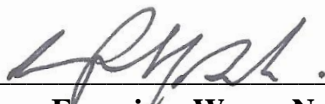
---

Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves/ UEPB  
Membro titular (3º Examinador)



---

Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez/ UEPB  
Membro titular (4º Examinador)



---

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

***“A persistência é o menor caminho do êxito”.***

*(Charles Chaplin)*

---

DEDICATÓRIA

---

A **Deus**, a força divina que me acompanha nos caminhos da vida.

A Ele, toda honra e toda glória!

A minha família, que me mostra diariamente o que é o amor incondicional, que supera a distância, a saudade e as ausências diárias: meus amados pais, **Ana Maria Dantas de Medeiros** e **Francisco das Chagas de Medeiros**, pelo altruísmo de toda uma vida em prol da felicidade das filhas, e minha irmã **Anna Tereza Dantas de Medeiros**, pelo companheirismo e amizade constantes.

*“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.*

*(Josué 1:9).*

## AGRADECIMENTOS

---



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao meu orientador, **Professor Doutor Cassiano Francisco Weege Nonaka**. Não existem palavras para expressar a gratidão que tenho pelo senhor, que é exemplo de empenho e dedicação no que faz. Agradeço verdadeiramente por todo os ensinamentos que foram transmitidos e pelas oportunidades que me permitiu abraçar. Sou muito grata por ter aceitado me orientar, que tanto contribuiu na minha formação profissional e que eu pudesse dar sequência à linha de pesquisa que te encantou durante sua pós-graduação – os ceratocistos odontogênicos. Trabalhar com a patologia não é fácil, agradeço por toda atenção, paciência e disponibilidade em me ajudar na compreensão desta pesquisa. Tenho muito orgulho em ser orientanda de um professor íntegro, correto e de inteligência imensurável. O senhor é fonte de inspiração sobre o significado de compromisso com a instituição, que através de conhecimento científico, trabalho e competência é possível obter recursos justos e desenvolver pesquisas grandiosas. Muito obrigada pela dedicação e compromisso para que eu pudesse concluir a minha tese de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por toda luz e proteção que Ele me proporcionou ao longo desta trajetória.

Aos meus pais, **Ana Maria** e **Francisco**, por todo amor e toda dedicação. Sou grata por todos os esforços que vocês dedicaram em prol da minha educação e por acreditarem nos meus sonhos, sempre torcendo pelas minhas conquistas. Amos vocês!

A minha irmã **Anna Tereza**, que sempre demonstra admiração por tudo que faço. Agradeço por todo apoio e amizade, sempre me motivando para seguir em frente.

Ao meu namorado **Lamartine Júnior**, que compreendeu as minhas ausências e me incentiva, com muito orgulho, a lutar pelos meus sonhos. Sua paciência e calma me fazem seguir a vida mais tranquila.

A todos os amigos do laboratório, **Allany, Amanda, Daniella, Emanuene, Geisa, Hellen, Ingrid, Jamesson, Lívia, Luan, Luana, Marayza, Matheus, Rodolfo, Robeci, Walter e Wiliana**. Sou grata pela convivência diária, pela troca de conhecimento e pelo auxílio mútuo. Nessa reta final, agradeço a **Allany, Amanda, Emanuene, Luana, Walter e Wiliana** que se empenharam na realização das etapas laboratoriais e muito ajudaram para concretização desta pesquisa. A **Hellen**, agradeço por tamanha contribuição nas contagens e finalização dos resultados. Não existe ambiente mais agradável na UEPB, para estudar e fazer amigos.

A **Emanuene** e **Ingrid**, muito obrigada pelo apoio, carinho e cumplicidade. Não esquecerei dos momentos agradáveis e das nossas conversas que tornaram a trajetória mais leve.

Às queridas **Ana Luzia** e **Denize**, além de técnicas, amigas, sempre dispostas a nos ajudar e ensinar. Além de ouvir e aconselhar sempre que foi necessário, agradeço pelo carinho e amizade.

Aos amigos do programa de pós-graduação, especialmente da minha **turma de Doutorado 2015.2** e das **turmas de mestrado 2015.2 e 2017.2**, pela convivência durante as disciplinas e por compartilhar momentos de descontração e conhecimento. Aos queridos amigos **Diego, Liege** e **Lívia**, como sou grata em contar com a amizade de pessoas tão especiais e que extrapolaram o ambiente acadêmico.

À **Profa. Dra. Isabela Pinheiro Cavalcanti Lima**, minha primeira orientadora, e minha mãe na UERN. Tenho muito respeito e admiração por você. Muito obrigada por todos os ensinamentos, e por acompanhar minha trajetória me incentivando pelo caminho da docência.

Às professoras **Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira** e **Dra. Pollianna Muniz Alves** pelas considerações e sugestões na qualificação deste projeto de pesquisa. Agradeço a ambas, pela disposição em ajudar e pelo exemplo de amor pela docência.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta tese, **Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, **Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti**, **Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves**, **Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, **Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes** e **Profa. Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos** que gentilmente aceitaram o convite, pela dedicação na leitura e pelas contribuições que serão apresentadas.

Aos professores, **Dra. Daniela Pita** e **Dr. Cassiano Nonaka**, coordenadores do programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB pelo incentivo e apoio durante o doutorado.

À **Profa. Dra. Roberta Barroso Cavalcante** e ao **Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)** que gentilmente cederam alguns casos para auxiliar na amostra deste estudo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta pesquisa, muito obrigada!



## RESUMO

A autofagia é um mecanismo de degradação intracelular que atua em vários processos fisiológicos e patológicos, envolvendo a ativação de uma série de proteínas, com destaque para Atg7, p62 e mTOR. Evidências sugerem uma participação significativa da autofagia no desenvolvimento de cistos e tumores odontogênicos, mas pouco se sabe sobre seu envolvimento na patogênese dos ceratocistos odontogênicos (COs). No contexto das lesões odontogênicas, os COs se destacam pelo comportamento potencialmente agressivo, com tendência à recidiva, e pela associação com a síndrome de Gorlin. Dessa forma, o presente estudo se propôs a avaliar a expressão imunohistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em COs isolados primários e COs associados à síndrome de Gorlin. A amostra consistiu em 24 COs isolados e 24 COs associados à síndrome de Gorlin que foram submetidos à técnica imunohistoquímica. A imunohistoexpressão de Atg7, p62 e p-mTOR foi avaliada no revestimento epitelial das lesões, determinando-se os percentuais de células positivas (nuclear e citoplasmática) e o predomínio da imunoreatividade nas camadas epiteliais. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio dos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Wilcoxon. Em todos os casos estudados foi observada expressão nuclear e citoplasmática de Atg7, com predomínio de imunoreatividade em camada basal/parabasal. De modo similar, todos os COs foram imunopositivos (núcleo e citoplasma) para p62, com predomínio de imunoreatividade em camada parabasal/superficial. Por sua vez, todos os COs apresentaram marcação citoplasmática de p-mTOR com predomínio de imunoreatividade em camadas superficiais, enquanto a positividade nuclear para p-mTOR foi constatada em 15 (62,5%) COs isolados e 14 (58,3%) COs síndrômicos. Quando comparados com os COs isolados, os COs síndrômicos exibiram maior imunohistoexpressão nuclear de p62 ( $p < 0,001$ ) e de Atg7 ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos de COs na expressão citoplasmática de p62 ( $p = 0,651$ ) e nuclear de p-mTOR ( $p = 0,717$ ). Por outro lado, os COs síndrômicos exibiram maior expressão citoplasmática de Atg7 ( $p < 0,001$ ) e p-mTOR ( $p = 0,023$ ) quando comparados aos casos isolados. Nas comparações intragrupos, foram observadas expressões citoplasmáticas de Atg7 ( $p < 0,001$ ) e p-mTOR ( $p < 0,001$ ) significativamente maiores do que as nucleares, tanto nos COs síndrômicos quanto nos COs isolados. Em contrapartida, a imunohistoexpressão nuclear de p62 foi maior do que a citoplasmática nos COs associados à síndrome de Gorlin ( $p < 0,001$ ). Os resultados sugerem um papel potencial da autofagia na patogênese dos COs. O comportamento biológico de COs síndrômicos provavelmente tem relação com a ativação da autofagia em camada basal/parabasal do revestimento epitelial, representada pela maior expressão citoplasmática de Atg7 e a menor imunopositividade do inibidor autofágico p-mTOR no citoplasma. Ademais, a maior translocação nuclear da proteína p62 no componente epitelial poderia contribuir para as diferenças no comportamento dos COs associados à síndrome de Gorlin, possivelmente através de funções não relacionadas à autofagia.

**Palavras-chave:** Ceratocisto odontogênico, síndrome de Gorlin, autofagia, imunohistoquímica.

**ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

Autophagy is an intracellular degradation mechanism that acts on several physiological and pathological processes, involving the activation of a series of proteins, especially Atg7, p62 and mTOR. Evidence suggests a significant participation of autophagy in the development of odontogenic cysts and tumors, but little is known about its involvement in the pathogenesis of odontogenic keratocysts (OKCs). In the context of odontogenic lesions, OKCs are characterized by a potentially aggressive behavior, with a tendency to recurrence, and by association with Gorlin syndrome. Thus, the present study aimed to evaluate the immunohistochemical expression of autophagy-related proteins (Atg7, p62 and p-mTOR) in odontogenic keratocysts associated with Gorlin syndrome (SOKCs) and non-syndromic odontogenic keratocysts (NSOKCs). The sample consisted of 24 SOKCs and 24 NSOKCs. The immunoexpression of Atg7, p62 and p-mTOR was evaluated in the epithelial component of the lesions, determining the percentages of positive (nuclear and cytoplasmic) cells and the predominance of immunoreactivity in the epithelial layers. The data obtained were statistically analyzed using non-parametric Mann-Whitney and Wilcoxon tests. In all cases studied, nuclear and cytoplasmic expression of Atg7 was observed, with predominance of immunoreactivity in the basal/parabasal layer. Similarly, all cases were immunopositive (nucleus and cytoplasm) for p62, with predominance of parabasal/superficial layer immunoreactivity. In turn, all OKCs showed cytoplasmic labeling of p-mTOR with predominance of immunoreactivity in superficial layers, while nuclear positivity was found in 15 (62.5%) NSOKCs and 14 (58.3%) SOKCs. SOKCs exhibited higher nuclear immunoexpression of p62 ( $p < 0.001$ ) and Atg7 ( $p < 0.001$ ) when compared to the NSOKCs. There was no significant difference between the groups of OKCs in the cytoplasmic expression of p62 ( $p = 0.651$ ) and nuclear p-mTOR ( $p = 0.717$ ). On the other hand, SOKCs exhibited higher cytoplasmic expression of Atg7 ( $p < 0.001$ ) and p-mTOR ( $p = 0.023$ ) when compared to NSOKCs. In the intragroup comparisons, cytoplasmic expressions of Atg7 ( $p < 0.001$ ) and p-mTOR ( $p < 0.001$ ) were observed significantly higher than the nuclear ones in both the SOKCs and the NSOKCs. In contrast, nuclear immunoexpression of p62 was greater than the cytoplasmic in SOKCs ( $p < 0.001$ ). The results suggest a potential role of autophagy in the pathogenesis of OKCs. The biological behavior of SOKCs probably correlates with the activation of autophagy in basal/parabasal layer of epithelial lining, represented by the higher cytoplasmic expression of Atg7 and the lower immunopositivity of the autophagic inhibitor p-mTOR in the cytoplasm. In addition, the greater nuclear translocation of the p62 protein in the epithelial component could contribute to the differences in the behavior of SOKCs, possibly through functions not related to autophagy.

**Keywords:** Odontogenic keratocyst, Gorlin syndrome, autophagy, immunohistochemistry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                 |                                                                                                                                                    |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Akt</b>                      | Do inglês <i>V-akt murine thymoma viral oncogene</i> , traduzido como Akt oncogene viral timoma murino.                                            |
| <b>AMPK</b>                     | Do inglês <i>AMP-activated protein kinase</i> , traduzido como proteína quinase ativada por AMP.                                                   |
| <b>Atg7</b>                     | Do inglês <i>autophagy-related protein 7</i> , traduzido como proteína 7 relacionada à autofagia.                                                  |
| <b>ATP</b>                      | Do inglês <i>triphosphate adenosine</i> , traduzido como adenosina trifosfato.                                                                     |
| <b>BNIP3</b>                    | Do inglês <i>adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i> , traduzido como proteína 3 interativa de proteína de adenovírus E1B 19 kDa.  |
| <b>°C</b>                       | Grau <i>Celsius</i> .                                                                                                                              |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>          | Cálcio.                                                                                                                                            |
| <b>CO</b>                       | Ceratocisto odontogênico.                                                                                                                          |
| <b>DNA</b>                      | Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucleico.                                                                 |
| <b>°GL</b>                      | Grau <i>Gay Lussac</i> , representa a porcentagem de álcool puro presente em uma mistura.                                                          |
| <b>GLI</b>                      | Fator de transcrição <i>Ci/glioma</i> .                                                                                                            |
| <b>HCl</b>                      | Ácido clorídrico.                                                                                                                                  |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Do inglês <i>hypoxia-inducible transcription factor-1<math>\alpha</math></i> , traduzido como fator de transcrição indutor de hipóxia-1 $\alpha$ . |
| <b>kDa</b>                      | Kilodalton.                                                                                                                                        |
| <b>LC3</b>                      | Do inglês <i>microtubule-associated protein 1-light chain 3</i> , traduzido como cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos.             |
| <b>MMP-9</b>                    | Do inglês <i>matrix metalloproteinase 9</i> , traduzido como metaloproteinase de matriz 9.                                                         |
| <b>mTOR</b>                     | Do inglês <i>mechanistic target of rapamycin</i> , traduzido como proteína alvo da rapamicina.                                                     |
| <b>NSOKC</b>                    | Do inglês <i>non-syndromic odontogenic keratocysts</i> , traduzido como ceratocisto odontogênico não síndrômico.                                   |
| <b>OMS</b>                      | Organização Mundial de Saúde.                                                                                                                      |

|                  |                                                                                                                                                    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PCR</b>       | Do inglês <i>polymerase chain reaction</i> , traduzido como reação em cadeia polimerase.                                                           |
| <b>PI3K/AKT:</b> | Do inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinase/Akt</i> , traduzido como fosfatidilinositol 3-quinase/Akt.                                              |
| <b>p-mTOR</b>    | Do inglês <i>phosphorylated mechanistic target of rapamycin</i> , traduzido como proteína alvo da rapamicina fosforilada.                          |
| <b>PTCH</b>      | Do inglês <i>patched</i> , refere-se ao gene <i>PTCH</i> ou à proteína PTCH.                                                                       |
| <b>PTCH1</b>     | Do inglês <i>patched</i> , refere-se ao gene <i>PTCH1</i> ou à proteína PTCH1.                                                                     |
| <b>PTCH2</b>     | Do inglês <i>patched</i> , refere-se ao gene <i>PTCH2</i> ou à proteína PTCH2.                                                                     |
| <b>ptch</b>      | Do inglês <i>patched</i> , refere-se ao gene <i>ptch</i> .                                                                                         |
| <b>p53</b>       | Do inglês <i>protein 53</i> , refere-se ao gene <i>P53</i> ou à proteína P53.                                                                      |
| <b>p62</b>       | Do inglês <i>protein 62</i> , refere-se ao gene <i>P62</i> ou à proteína P62.                                                                      |
| <b>RNA</b>       | Do inglês <i>ribonucleic acid</i> , traduzido como ácido ribonucleico.                                                                             |
| <b>RPS6</b>      | Do inglês <i>phosphorylated-ribosomal protein S6</i> , traduzido como proteína ribossômica S6.                                                     |
| <b>SHH</b>       | Do inglês <i>sonic hedgehog</i> , refere-se ao gene <i>SHH</i> , à proteína SHH ou à via de sinalização SHH.                                       |
| <b>SMO</b>       | Do inglês <i>smoothened</i> , refere-se ao gene <i>SMO</i> ou à proteína SMO.                                                                      |
| <b>SOKC</b>      | Do inglês <i>odontogenic keratocysts associated with Gorlin syndrome</i> , traduzido como ceratocisto odontogênico associado à síndrome de Gorlin. |
| <b>SQSTM1</b>    | Do inglês <i>sequestosome 1</i> , refere-se ao gene <i>SQSTM1</i> ou à proteína SQSTM1.                                                            |
| <b>TRIS</b>      | Tris-hidroximetil-aminometano.                                                                                                                     |
| <b>UNIFOR</b>    | Universidade de Fortaleza.                                                                                                                         |
| <b>UEPB</b>      | Universidade Estadual da Paraíba.                                                                                                                  |
| <b>USA</b>       | Do inglês <i>United States of America</i> , traduzido como Estados Unidos da América.                                                              |
| <b>µm</b>        | Micrometro.                                                                                                                                        |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Página</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Quadro 1.</b> Critérios diagnósticos para a Síndrome de Gorlin, de acordo com Evans <i>et al.</i> (1993).....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 33            |
| <b>Quadro 2.</b> Elenco de variáveis avaliadas no estudo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 34            |
| <b>Quadro 3.</b> Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....                                                                                                                                                                                                                                                     | 37            |
| <b>Figura 1</b> Imunoexpressão de Atg7 em camada basal/ parabasal em CO isolado (A) e em CO associado à síndrome de Gorlin (B) (Reveal, 400×). Expressão de p62 em camada parabasal/superficial em CO isolado (C) e em CO associado à síndrome de Gorlin (D) (Reveal, 400×). Imunoexpressão de p-mTOR em camada superficial em CO isolado (E) e em CO associado à síndrome de Gorlin (F) (Reveal, 400×)..... | 56            |
| <b>Figura 2</b> Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade (citoplasma e núcleo) para Atg7, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de COs. (A) Imunoexpressão de Atg7; (B) Imunoexpressão de p62; (C) Imunoexpressão de p-mTOR.....                                                                                                                                                          | 57            |

## LISTA DE TABELAS

---

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                      | <b>Página</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Tabela 1.</b> Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.                 | 54            |
| <b>Tabela 2.</b> Distribuição dos casos de CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para as proteínas Atg7, p62 e p-mTOR no tecido epitelial..... | 55            |

## SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

|              | <b>Página</b>                           |
|--------------|-----------------------------------------|
| <b>1</b>     | <b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b> 24   |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS.....</b> 30                |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL..... 30                  |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 30           |
| <b>3</b>     | <b>METODOLOGIA.....</b> 32              |
| 3.1          | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... 32            |
| 3.2          | CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO..... 32        |
| 3.3          | POPULAÇÃO..... 32                       |
| 3.4          | AMOSTRA..... 32                         |
| <b>3.4.1</b> | <b>Critérios de inclusão.....</b> 32    |
| <b>3.4.2</b> | <b>Critérios de exclusão.....</b> 33    |
| 3.5          | VARIÁVEIS..... 33                       |
| 3.6          | ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO..... 35         |
| <b>3.6.1</b> | <b>Método imunoistoquímico.....</b> 35  |
| <b>3.6.2</b> | <b>Análise imunoistoquímica.....</b> 37 |
| 3.7          | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 38             |
| <b>4</b>     | <b>ARTIGO.....</b> 40                   |
| 4.1          | APRESENTAÇÃO..... 40                    |
| 4.2          | ARTIGO A SER SUBMETIDO..... 41          |
| <b>5</b>     | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b> 59     |
|              | <b>REFERÊNCIAS.....</b> 61              |
|              | <b>APÊNDICES.....</b> 66                |
|              | <b>ANEXOS.....</b> 68                   |



## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

---

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O ceratocisto odontogênico (CO) é classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um cisto de desenvolvimento que se origina dos remanescentes da lâmina dentária (SPEIGHT *et al.*, 2017). Dentre as lesões odontogênicas, o CO se destaca pelo crescimento infiltrativo, comportamento potencialmente agressivo e altas taxas de recorrências (ANTONOGLOU *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2016; SPEIGHT *et al.*, 2017; KAHRAMAN; GUNHAN; CELASUN, 2018; KINARD *et al.*, 2018). Estudos têm relacionado a patogênese do CO com alterações no gene *PTCH1*, as quais determinam a ativação da via de sinalização *sonic hedgehog* (SHH) e resultam em proliferação exacerbada dos remanescentes epiteliais odontogênicos (KADLUB *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2016; SPEIGHT *et al.*, 2017). Além disso, alguns COs apresentam associação com a síndrome de Gorlin, um distúrbio genético caracterizado pela presença de múltiplos COs, predisposição a neoplasias e a anormalidades do desenvolvimento (QU *et al.*, 2015; ONODERA *et al.*, 2017, SPEIGHT *et al.*, 2017; AKBARI *et al.*, 2018).

Estudos têm sugerido um comportamento biológico distinto entre COs isolados e COs associados à síndrome de Gorlin, considerando diferenças observadas na composição da matriz extracelular (AMORIM *et al.*, 2004), na expressão de proteases (LEONARDI *et al.*, 2010) e proteínas envolvidas na remodelação óssea (HONG *et al.*, 2014), bem como na expressão de proteínas da via SHH (HOYOS CADAVID *et al.*, 2018). Por outro lado, os resultados de pesquisas sobre a presença de miofibroblastos (NONAKA *et al.*, 2012) e sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular (FIGUEROA *et al.*, 2010), ao reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) (DE BRITO MONTEIRO *et al.*, 2015) e ao transporte de glicose (LEITE *et al.*, 2017) não constatarem diferenças significativas entre COs isolados e associados à síndrome de Gorlin. Apesar de constituírem objeto de diversas pesquisas, os mecanismos responsáveis pelas diferenças no comportamento biológico dessas lesões não estão totalmente compreendidos.

Na patogênese de lesões císticas, estudos evidenciam o papel da autofagia nas doenças policísticas renal (REN *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2017; CHOU *et al.*, 2019) e hepática (MASYUK *et al.*, 2018). A autofagia é um sistema de catabolismo intracelular em massa, que compreende diversas vias de sinalização e múltiplas proteínas (DUNLOP; TEE, 2014; CHOU *et al.*, 2019). Neste processo, as células degradam seus próprios componentes citoplasmáticos dentro dos lisossomos, regulam seu volume e utilizam os produtos derivados desta degradação para sua sobrevivência (DUNLOP; TEE, 2014; JING *et al.*, 2015). A iniciação da

autofagia envolve a participação de mais de 30 genes que codificam proteínas da família Atg, com destaque para Atg5, Atg6, Atg7 e Atg12 (XIONG, 2015). Outros componentes importantes desse mecanismo incluem a proteína p62, também designada sequestossomo 1 (SQSTM1), que representa um potencial marcador do fluxo autofágico (KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012; CHU *et al.*, 2014; JIANG; MIZUSHIMA, 2015) e a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma molécula-chave na detecção de nutrientes que participa na regulação da autofagia (DUNLOP; TEE, 2014; APPUHAMY *et al.*, 2014; HANSEN; RUBINSZTEIN; WALKER, 2018).

O termo “autofagia” geralmente indica a macroautofagia, que se caracteriza pela inclusão de organelas e parte do citoplasma em estruturas de dupla membrana, denominadas autofagossomos. O autofagossomo, em sequência, entrega o material a ser catalisado para os lisossomos (JING *et al.*, 2015). A iniciação da autofagia envolve diversos membros da família de proteínas Atg, com destaque para Atg6 (Beclina-1), Atg5 e Atg12. A formação do autofagossomo envolve um sistema de conjugação no qual a Atg12 é covalentemente ligada à Atg5 e direcionada à membrana do autofagossomo. Tal conjugação é mediada pelas enzimas Atg7 e Atg10. Além disso, a proteína Atg8 também denominada cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3) sofre lipidação por Atg7 e, em consequência, acopla-se à membrana do autofagossomo em formação (KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012; JIANG; MIZUSHIMA, 2015). De forma similar, as proteínas Atg7 e Atg10 promovem a união de Atg12 às proteínas Atg5 e Atg16L1. Em seguida, este complexo é direcionado à membrana externa do autofagossomo em formação (NETEA-MAIER *et al.*, 2015).

A proteína mTOR é uma serina-treonina quinase presente em dois complexos proteicos citoplasmáticos: complexo mTOR insensível à rapamicina (proteínas mTOR, GβL e Rictor) e complexo mTOR sensível à rapamicina (proteínas mTOR, GβL e Raptor). A principal função da mTOR é atuar como sensor dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) e aminoácidos, a fim de coordenar o balanço e a disponibilidade de nutrientes e o crescimento celular (APPUHAMY *et al.*, 2014). Quando a autofagia e a síntese proteica são ativadas, Akt fosforila a proteína mTOR no sítio de ativação Ser2448 e, a partir desta primeira fosforilação, mTOR realiza autofosforilação da Ser2481. Uma vez ativada, mTOR inibe o processo autofágico e ativa a proteína p70S6, uma quinase ativada por sinalização mitogênica necessária para o crescimento celular e para a passagem pela fase G1 do ciclo celular (APPUHAMY *et al.*, 2014).

A proteína p62 está envolvida na degradação de proteínas dependente de proteassomos ou lisossomos (SAIYIN *et al.*, 2014). A p62 é incorporada nos autofagossomos por interação

direta com LC3II e, subsequentemente, degradada durante o processo de autofagia (SAIYIN *et al.*, 2014). Neste sentido, quando a autofagia é inibida, a p62 se acumula no interior da célula. Por outro lado, quando há indução da autofagia, observa-se redução nos níveis intracelulares de p62 (JIANG; MIZUSHIMA, 2015). Dessa forma, a proteína p62 tem sido sugerida como um marcador para avaliar o fluxo autofágico (KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012; JIANG; MIZUSHIMA, 2015). É importante salientar que outras proteínas estão envolvidas na sinalização da autofagia, modulando o processo autofágico positiva ou negativamente (DUNLOP; TEE, 2014).

No contexto das lesões odontogênicas, os poucos estudos existentes sugerem uma participação significativa da autofagia na patogênese de cistos e tumores (CHAI SUPARAT *et al.*, 2013; OKADA *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; ZHONG *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2018; SHARP *et al.*, 2019), influenciando as características arquiteturais das lesões além de constituir um possível indicador prognóstico (CHAI SUPARAT *et al.*, 2013; OKADA *et al.*, 2014).

Em estudo imunoistoquímico, Chaisuparat *et al.* (2013) avaliaram a via de sinalização Akt/mTOR em cistos dentígeros, ameloblastomas e COs. Em comparação com os cistos dentígeros, os ameloblastomas e os COs revelaram maiores percentuais de casos positivos para as formas fosforiladas de Akt (Ser473) e da proteína ribossômica S6 (RPS6). Para a proteína fosforilada Akt (Thr308), os ameloblastomas exibiram maior percentual de casos positivos em relação aos cistos dentígeros e COs. Não foram observadas correlações significativas entre as imunorexpressões das proteínas e os diversos parâmetros clinicopatológicos avaliados. Segundo Chaisuparat *et al.* (2013), a via Akt/mTOR se encontra ativa nos cistos dentígeros, ameloblastomas e COs, e pode estar envolvida no desenvolvimento destas lesões.

Okada *et al.* (2014) analisaram a imunorexpressão das proteínas Atg7, LC3 e p62 em folículos dentários, ameloblastomas sólidos e ameloblastomas unicísticos. Nos ameloblastomas, as células epiteliais próximas à membrana basal exibiram maior expressão das proteínas relacionadas à autofagia em comparação com as células situadas nas áreas centrais das lesões. Quando comparados aos ameloblastomas sólidos, os ameloblastomas unicísticos apresentaram maior expressão das proteínas Atg7, LC3 e p62. Particularmente para a proteína LC3, a expressão foi significativamente maior em ameloblastomas de células granulares do que em outros subtipos histológicos. Além disso, ameloblastomas recorrentes revelaram expressão significativamente menor das proteínas LC3 e p62 em comparação com ameloblastomas primários. De acordo com Okada *et al.* (2014), a autofagia estaria envolvida

na diferenciação celular e na determinação das características arquiteturais dos ameloblastomas, além de constituir um possível indicador prognóstico para estas lesões.

Li *et al.* (2014) avaliaram a expressão de proteínas relacionadas à autofagia (Beclina-1, Atg5, Atg7, LC3 e p62), por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa e imunoistoquímica, em cistos radiculares e COs. Em comparação com os cistos radiculares, os COs revelaram maior expressão gênica de Beclina-1, Atg5 e Atg7. Na análise imunoistoquímica, os COs também exibiram maiores níveis de expressão de Beclina-1, Atg7, LC3 e p62, quando comparados aos cistos radiculares. Adicionalmente, por meio de imunofluorescência, os autores observaram uma distribuição parcialmente sincrônica das proteínas relacionadas à autofagia com marcadores de proliferação celular e apoptose nos COs. Para Li *et al.* (2014), tais achados sugerem que o potencial de crescimento dos COs pode estar associado à ativação da autofagia nestas lesões.

Com base nos resultados obtidos no estudo de Li *et al.* (2014), o mesmo grupo de pesquisadores avaliou o possível envolvimento da autofagia na regulação da degradação das conexinas nas células epiteliais dos COs (ZHONG *et al.*, 2015). As conexinas constituem uma família de proteínas, com mais de 20 análogos estruturais, que estão envolvidas na formação das junções intercelulares comunicantes (VINKEN *et al.*, 2006; NAUS; LAIRD, 2010). Os autores evidenciaram uma correlação negativa das expressões de LC3 e p62 com as expressões das conexinas-32 e -43. Além disso, análises por imunofluorescência revelaram que estruturas positivas para as conexinas-32 e -43 estavam colocalizadas com estruturas positivas para as proteínas LC3 e p62. Esta colocalização foi constatada especialmente em regiões citoplasmáticas perinucleares e apenas raramente na membrana citoplasmática. De acordo com Zhong *et al.* (2015), a ativação da autofagia pode contribuir para a degradação das conexinas-32 e -43 nos COs.

Huang *et al.* (2018) avaliaram a expressão de proteínas relacionadas à hipóxia (HIF-1 $\alpha$ , BNIP3 e pAMPK) e à autofagia (LC3, Beclina-1, Atg5-12 e p62) em cistos radiculares, granulomas periapicais e polpa dental. Foi realizado estudo imunoistoquímico, testes de *Western blot* e análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão. Em comparação com a polpa normal, ambas as lesões periapicais exibiram escores imunoistoquímicos significativamente maiores para pAMPK, HIF-1 $\alpha$ , BNIP3, Beclina-1 e Atg5-12. Nas análises por *Western blot*, as lesões periapicais exibiram maiores níveis de expressão das proteínas relacionadas à hipóxia e das proteínas Atg5-12, quando comparadas à polpa normal. Além disso, foram observados autofagossomos e autolisossomos na análise ultraestrutural de cistos radiculares e granulomas periapicais. Segundo Huang *et al.* (2018), os

resultados sugerem que a autofagia associada à hipóxia pode ter um importante papel no desenvolvimento e na manutenção das lesões periapicais.

Por sua vez, Sharp *et al.* (2019) analisaram a autofagia e capacidade clonogênica em culturas de células epiteliais e mesenquimais derivadas de ameloblastomas sólidos. As células epiteliais exibiram maior clonogenicidade e demonstraram altos níveis de expressão de proteínas autofágicas (LC3, p62 e melanorregulina) quando comparadas às células mesenquimais e aos controles, através de análises de *Western blot*. Adicionalmente, as células epiteliais obtidas dos ameloblastomas foram enxertadas *in vivo* em um modelo animal, sendo observada a regeneração tumoral com características histológicas semelhantes ao tipo folicular do ameloblastoma. Os enxertos epiteliais apresentaram invaginações no estroma, os quais demonstraram forte positividade imunoistoquímica para LC3 e p62, principalmente em células apresentando transição epitélio-mesenquimal. Para Sharp *et al.* (2019), a autofagia poderia contribuir para a sobrevivência das células epiteliais do ameloblastoma e, eventualmente, favorecer a recorrência desta lesão.

Apesar do seu papel multifuncional em diversos processos fisiológicos e patológicos, pouco se sabe sobre uma eventual participação da autofagia na patogênese de cistos odontogênicos de desenvolvimento, incluindo os COs. Nesse sentido, o presente estudo se propôs a avaliar a imunexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em COs isolados e associados à síndrome de Gorlin, com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão das diferenças no comportamento biológico e subsidiar estratégias terapêuticas para essas lesões.

## OBJETIVOS

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo se propôs a avaliar a expressão imunoistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em COs isolados e COs associados à síndrome de Gorlin.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os percentuais de imunorreatividade nuclear e citoplasmática das proteínas Atg7, p62 e p-mTOR no componente epitelial das lesões e compará-los de acordo com os grupos estudados (COs isolados e COs associados à síndrome de Gorlin);
- Analisar a imunexpressão das proteínas Atg7, p62 e p-mTOR em relação às camadas epiteliais dos COs.



**METODOLOGIA**

---

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), respeitando a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde. O protocolo foi aprovado conforme parecer nº 2.295.348/ CAAE nº 73520017.2.0000.5187 (ANEXO A).

#### **3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

O estudo consistiu em uma pesquisa observacional, com desenho transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das expressões imunoistoquímicas das proteínas Atg7, p62 e p-mTOR em COs isolados e COs associados à síndrome de Gorlin.

#### **3.3 POPULAÇÃO**

A população do estudo foi constituída por todos os casos de COs diagnosticados e arquivados nos Laboratórios de Histopatologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e do Departamento de Odontologia da UEPB.

#### **3.4 AMOSTRA**

Mediante a técnica de amostragem do tipo não probabilista, por conveniência, foram selecionados 24 casos de COs isolados primários e 24 casos de COs associados à síndrome de Gorlin, todos emblocados em parafina.

##### **3.4.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de COs que apresentavam material biológico suficiente para realização do estudo imunoistoquímico e cujos blocos de parafina estavam em bom estado de conservação. Para o grupo de lesões sindrômicas, foram selecionados apenas os casos cujas fichas clínicas dos pacientes contivessem informações

suficientes para a confirmação do diagnóstico da síndrome de Gorlin, conforme critérios propostos por Evans *et al.* (1993) (QUADRO 1).

**Quadro 1.** Critérios diagnósticos para a síndrome de Gorlin, de acordo com Evans *et al.* (1993).

| <i>Critérios Principais</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mais de dois carcinomas de células basais, sendo um destes antes dos 30 anos de idade; ou mais de dez nevos basocelulares</li> <li>• Qualquer CO (diagnosticado histologicamente) ou cisto ósseo polioestótico</li> <li>• Três ou mais fossetas palmares ou plantares</li> <li>• Calcificações ectópicas em pacientes abaixo dos 20 anos de idade (calcificações lamelares ou precoces da foice do cérebro)</li> <li>• História familiar positiva para síndrome de Gorlin</li> </ul> |
| <i>Critérios Secundários</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anomalias esqueléticas congênicas (costelas bífidas, fusionadas ou ausentes; vértebras bífidas ou fusionadas)</li> <li>• Circunferência occípito-frontal maior que o percentil 97, com bosselamento frontal</li> <li>• Fibromas ovarianos ou cardíacos</li> <li>• Meduloblastomas</li> <li>• Cistos linfo-mesentéricos</li> <li>• Malformações congênicas como fendas lábio-palatais, polidactilismo e anomalias oculares (catarata e colobomas)</li> </ul>                          |

### 3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os casos provenientes de biópsia incisional e os casos recorrentes. Além disso os casos que se apresentaram, após análise histopatológica, secundariamente inflamados foram excluídos da amostra.

## 3.5 VARIÁVEIS

As variáveis independentes e dependentes que foram analisadas no presente estudo estão listadas no Quadro 2.

**Quadro 2.** Elenco de variáveis avaliadas no estudo.

| VARIÁVEL | DEFINIÇÃO                                                                           | CATEGORIA                                                                                                                                                                              | TIPO                         |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| CO       | Classificação da lesão considerando sua associação ou não com a síndrome de Gorlin. | - Isolado primário<br>- Síndrômico                                                                                                                                                     | Independente<br>(Categórica) |
| Atg7     | Imunomarcção para Atg7 em células epiteliais.                                       | - Percentual de células com positividade citoplasmática<br>- Percentual de células com positividade nuclear                                                                            | Dependente<br>(Quantitativa) |
| Atg7     | Predomínio da imunorreatividade para Atg7 de acordo com as camadas epiteliais.      | -Imunomarcção em camada basal/ parabasal<br>-Imunomarcção em camada parabasal/ superficial<br>-Imunomarcção em camada superficial<br>- Imunomarcção em toda a extensão do revestimento | Dependente<br>(Categórica)   |
| p-mTOR   | Imunomarcção para p-mTOR em células epiteliais.                                     | - Percentual de células com positividade citoplasmática<br>- Percentual de células com positividade nuclear                                                                            | Dependente<br>(Quantitativa) |
| p-mTOR   | Predomínio da imunorreatividade para p-mTOR de acordo com as camadas epiteliais.    | -Imunomarcção em camada basal/ parabasal<br>-Imunomarcção em camada parabasal/ superficial<br>-Imunomarcção em camada superficial<br>- Imunomarcção em toda a extensão do revestimento | Dependente<br>(Categórica)   |
| p62      | Imunomarcção para p62 em células epiteliais.                                        | - Percentual de células com positividade citoplasmática<br>- Percentual de células com                                                                                                 | Dependente<br>(Quantitativa) |

|     |                                                                               |                                                                                                                                                                                        |                         |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|     |                                                                               | positividade nuclear                                                                                                                                                                   |                         |
| p62 | Predomínio da imunorreatividade para p62 de acordo com as camadas epiteliais. | -Imunomarcção em camada basal/ parabasal<br>-Imunomarcção em camada parabasal/ superficial<br>-Imunomarcção em camada superficial<br>- Imunomarcção em toda a extensão do revestimento | Dependente (Categórica) |

### 3.6 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

#### 3.6.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3 µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltrietoxissilano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Reveal<sup>TM</sup>*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), utilizando anticorpos primários monoclonais anti-Atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR.

Como controle positivo para os anticorpos anti-Atg7 e anti-p62, foram utilizados cortes histológicos de granuloma periapical e hiperplasia fibrosa inflamatória, respectivamente. Para o anticorpo anti-p-mTOR, o controle positivo foi realizado no parênquima glandular observado em espécimes de mucocele. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo imunoistoquímicos.

A técnica seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, conforme descrito abaixo:

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);

⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:

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

- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 3);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida;
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário (*Complement*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (2 trocas);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP conjugated*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*DAB substrate system*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA) (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (8 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

**Quadro 3.** Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

| Especificidade | Referência | Fabricante     | Diluição | Recuperação antigênica                             | Incubação        |
|----------------|------------|----------------|----------|----------------------------------------------------|------------------|
| Atg7           | ab52472    | Abcam          | 1:750    | Tris-EDTA, pH 9,0<br><i>Steamer</i> , 90°C, 60 min | 60 minutos       |
| p62            | ab56416    | Abcam          | 1:600    | Tris-EDTA, pH 9,0<br><i>Steamer</i> , 90°C, 60 min | 60 minutos       |
| p-mTOR         | #2976      | Cell Signaling | 1:200    | Citrato, pH 6,0<br><i>Steamer</i> , 90°C, 60 min   | <i>Overnight</i> |

### 3.6.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por uma examinadora previamente treinada. Destaca-se que a análise imunoistoquímica foi realizada sem que esta examinadora tivesse conhecimento se o caso em questão se referia a uma lesão isolada ou associada à síndrome de Gorlin.

A análise da expressão das proteínas Atg7, p62 e p-mTOR foi realizada no componente epitelial das lesões. Adaptando-se a metodologia empregada no estudo de Leonardi *et al.* (2013), os casos foram classificados, de acordo com o predomínio da imunorreatividade para as proteínas avaliadas nas camadas epiteliais, em: imunomarcção em camada basal/parabasal, imunomarcção em camada parabasal/superficial, imunomarcção em camada superficial e imunomarcção em toda a extensão do revestimento.

Além disso, baseada na metodologia utilizada no estudo de Brito *et al.* (2018), realizou-se uma análise quantitativa da imunoexpressão das Atg7, p62, e p-mTOR considerando a marcação citoplasmática e nuclear dessas proteínas, separadamente. Foi identificada a área epitelial com maior imunopositividade para Atg7, p62 e p-mTOR sob aumento de 100×. Em seguida, sob aumento de 400×, 10 campos microscópicos foram

fotomicrografados (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. As células epiteliais positivas e negativas foram contadas em cada um dos campos microscópicos fotomicrografados através do programa *ImageJ*® (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, SA). Por fim, estabeleceu-se o percentual de células com positividade nuclear ou citoplasmática em relação ao total de células contadas. Os dados obtidos com a análise imunoistoquímica foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com o estudo imunoistoquímico foram organizados em um banco de dados informatizado e analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Os dados provenientes da análise das imunorexpressões de Atg7, p62 e p-mTOR foram analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Desse modo, comparações entre as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos de COs foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Por sua vez, o teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para as comparações pareadas e intragrupos entre as expressões citoplasmática e nuclear de cada proteína avaliada. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).



ARTIGO

---

## 4 ARTIGO

### 4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa foi desenvolvido e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Mediante execução desse projeto, um artigo é apresentado nesta tese: “**Imunoexpressão de proteínas relacionadas a autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin**”.

O artigo será submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine* (ISSN: 1600-0714; Fator de impacto: 2.03; Qualis Odontologia/Referência A2), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

## 4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

### **Imunoexpressão de proteínas relacionadas a autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin**

Título breve: **Autofagia em ceratocistos odontogênicos**

Fabianna da Conceição Dantas de Medeiros<sup>1</sup>, Hellen Bandeira de Pontes Santos<sup>2</sup>, Roberta Barroso Cavalcante<sup>3</sup>, Renato Luiz Maia Nogueira<sup>4</sup>, Manuel Antonio Gordón-Núñez<sup>1</sup>, Pollianna Muniz Alves<sup>1</sup>, Cassiano Francisco Weege Nonaka<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.*

<sup>3</sup>*Universidade de Fortaleza, Departamento de Patologia Oral, Fortaleza, CE, Brasil.*

<sup>4</sup>*Universidade Federal do Ceará, Departamento de Cirurgia Oral, Fortaleza, CE, Brasil.*

#### **Autor correspondente:**

Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Juvêncio Arruda, s/n – Bodocongó – Campina Grande – PB – Brasil

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

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

## ABSTRACT

**Background:** Autophagy is an intracellular degradation system involved in several pathological processes, but little is known about its participation in the pathogenesis of odontogenic keratocysts (OKCs). This study evaluated the immunoexpression of autophagy-related proteins (Atg7, p62 and p-mTOR) in odontogenic keratocysts associated with Gorlin syndrome (SOKCs) and non-syndromic odontogenic keratocysts (NSOKCs).

**Methods:** Twenty-four SOKCs and 24 NSOKCs were selected for this study. Percentages of immunopositive nuclear and cytoplasmic cells for Atg7, p62 and p-mTOR in the epithelial component of the lesions were assessed. Results were analyzed statistically using nonparametric Mann-Whitney test and Wilcoxon test.

**Results:** Expression of p62, Atg7 and cytoplasmic immunostaining of p-mTOR was observed in all cases studied. The predominance of Atg7 immunoreactivity was in the basal/parabasal layer, p62 was in the parabasal / superficial layer and p-mTOR was in the superficial layers of epithelium. SOKCs exhibited higher cytoplasmic expression of Atg7 ( $P<0.001$ ) and p-mTOR ( $P=0.023$ ) when compared to NSOKCs. On the other hand, SOKCs exhibited higher nuclear expression of p62 ( $P<0.001$ ) and Atg7 ( $P<0.001$ ) when compared to NSOKCs. No significant difference in the cytoplasmic expression of p62 was observed between groups ( $P=0.767$ ).

**Conclusion:** The results suggest a potential role of autophagy in pathogenesis of OKCs. The biological behavior of SOKCs probably correlates with the activation of autophagy in basal/parabasal layer of epithelium, represented by higher cytoplasmic expression of Atg7 and lower immunopositivity of autophagic inhibitor p-mTOR in cytoplasm. In addition, the greater nuclear translocation of p62 protein could contribute to the differences in behavior of SOKCs.

**keywords:** Odontogenic cyst, basal cell nevus syndrome, autophagy-related protein 7, sequestosome-1 protein, mTOR associated protein.

## Introdução

O ceratocisto odontogênico (CO) é um cisto de desenvolvimento, com origem nos remanescentes da lâmina dentária,<sup>1</sup> que se caracteriza pelo crescimento infiltrativo, comportamento potencialmente agressivo e taxas elevadas de recorrências.<sup>1,2,3</sup> Além disso, os COs destacam-se entre as lesões odontogênicas pelas alterações no gene *PTCH1* e pela associação ocasional com a síndrome de Gorlin.<sup>3,4</sup>

A existência de diferenças na patogênese e no comportamento biológico de COs isolados e associados à síndrome de Gorlin tem sido objeto de relevantes discussões na literatura.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Pesquisas sobre a expressão de proteases<sup>5</sup> e de proteínas envolvidas na remodelação óssea<sup>6</sup> e na via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH),<sup>7</sup> demonstraram diferenças importantes entre COs isolados e associados à síndrome de Gorlin. Em contrapartida, estudos sobre a presença de miofibroblastos<sup>8</sup> e sobre a expressão de proteínas relacionadas ao reparo do DNA<sup>9</sup> e ao transporte de glicose<sup>10</sup> não constataram diferenças significativas entre esses grupos de COs.

Na patogênese de lesões císticas, estudos recentes têm enaltecido o papel da autofagia nas doenças policísticas renal<sup>11,12</sup> e hepática.<sup>13</sup> A autofagia é um sistema de degradação intracelular em massa, que compreende diversas vias de sinalização e múltiplas proteínas.<sup>12,14</sup> A iniciação da autofagia envolve a participação de mais de 30 genes que codificam proteínas da família Atg, com destaque para Atg5, Atg6, Atg7 e Atg12.<sup>15</sup> Outros componentes importantes no campo da autofagia incluem a proteína p62, também designada sequestossomo 1 (SQSTM1), que representa um potencial marcador do fluxo autofágico,<sup>16</sup> e a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma molécula-chave na detecção de nutrientes que participa na regulação da autofagia.<sup>14</sup>

No contexto das lesões odontogênicas, os poucos estudos sugerem uma participação significativa da autofagia na patogênese de cistos e tumores,<sup>17,18,19,20,21,22</sup> influenciando as características arquiteturais das lesões, além de constituir um possível indicador prognóstico.<sup>17,18</sup> Apesar do seu papel multifuncional em diversos processos fisiológicos e patológicos, pouco se sabe sobre a participação da autofagia na patogênese dos COs. Dessa forma, o presente estudo se propôs a avaliar a imunoexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em COs isolados e associados à síndrome de Gorlin.

## **Materiais e métodos**

### *Amostra*

Foram selecionados 48 casos de COs, incluindo 24 COs isolados primários e 24 COs associados à síndrome de Gorlin, obtidos nos Laboratórios de Patologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Em todos os casos, o diagnóstico histopatológico dos COs foi realizado de acordo com a quarta classificação dos cistos odontogênicos da OMS<sup>1</sup>. Todos os pacientes com síndrome de Gorlin foram diagnosticados com base nos critérios propostos por Evans et al,<sup>23</sup> e apresentavam múltiplos COs. Os pacientes com COs isolados primários apresentavam lesões únicas e foram submetidos a avaliações clínicas e radiográficas para excluir outras manifestações da síndrome de Gorlin. Foram incluídos na pesquisa apenas os casos de COs com material biológico suficiente para o estudo imunoistoquímico. Os casos provenientes de biópsia incisional e aqueles que se apresentaram, após análise histopatológica, secundariamente inflamados foram excluídos da amostra. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB, Campina Grande, Brasil (Parecer nº 2.295.348).

### *Imunoistoquímica*

O material biológico fixado em formol a 10% e emblocado em parafina foi submetido a cortes histológicos com 3µm de espessura e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano. Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Tabela 1). Em seguida, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para bloquear a peroxidase endógena tecidual. Após a incubação com os anticorpos primários monoclonais anti-atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR, os cortes foram lavados com tampão Tris-HCl e tratados com um complexo à base de polímero (*Reveal*<sup>TM</sup>; Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada por imersão dos cortes histológicos em diaminobenzidina (*DAB Substrate System*; Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA). Por fim, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com lamínula.

Cortes histológicos de granuloma periapical e hiperplasia fibrosa inflamatória foram utilizados como controle positivo para os anticorpos anti-Atg7 e anti-p62, respectivamente. Para o anticorpo anti-p-mTOR, o controle positivo foi realizado com parênquima glandular salivar observado em espécimes de mucocele. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo imunoistoquímico descrito anteriormente.

### *Análise imunoistoquímica*

Os cortes teciduais foram analisados sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por uma examinadora previamente treinada. Destaca-se que a análise imunoistoquímica foi realizada sem que esta examinadora tivesse conhecimento se o caso em questão se referia a uma lesão isolada ou associada à síndrome de Gorlin.

A análise da expressão das proteínas Atg7, p62 e p-mTOR foi realizada no componente epitelial das lesões. Adaptando-se a metodologia empregada no estudo de Leonardi et al,<sup>5</sup> os casos foram classificados, de acordo com o predomínio da imunorreatividade para as proteínas avaliadas nas camadas epiteliais, em: imunomarcção em camada basal/parabasal, imunomarcção em camada parabasal/superficial, imunomarcção em camada superficial e imunomarcção em toda a extensão do revestimento.

Além disso, com base na metodologia utilizada no estudo de Brito et al,<sup>24</sup> realizou-se uma análise quantitativa da imunoexpressão de Atg7, p62 e p-mTOR considerando a marcação citoplasmática e nuclear dessas proteínas, separadamente. Sob aumento de 100×, foram identificados 10 campos de maior imunorreatividade aos anticorpos anti-Atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR. Cada campo foi fotomicrografado (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sob aumento de 400×, e as imagens obtidas foram transferidas para o programa ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, SA). As células epiteliais positivas e negativas foram contadas em cada um dos campos microscópicos fotomicrografados e, por fim, estabeleceu-se o percentual de células com positividade nuclear ou citoplasmática em relação ao total de células contadas.

### *Análise estatística*

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Os dados obtidos com o estudo das imunoexpressões de Atg7, p62 e p-mTOR foram analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Dessa forma, comparações entre as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos de COs foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Por sua vez, o teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para as comparações pareadas e intragrupos entre as expressões citoplasmática e nuclear de cada proteína avaliada. Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## Resultados

### *Imunoexpressão de Atg7*

Expressões citoplasmáticas e nucleares de Atg7 foram constatadas em todos os casos de COs analisados, com predomínio de imunorreatividade em camada basal/parabasal do epitélio dos COs isolados e em todas as camadas dos COs associados à síndrome de Gorlin (Figura 1A,B) (Tabela 2).

Em relação à imunoexpressão citoplasmática, foi observada mediana de 75,9% (*range*: 45,5% – 91,3%) nos COs associados à síndrome de Gorlin e de 56,6% (*range*: 23,6% – 84,2%) nos COs isolados primários, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ) (Figura 2A). A análise da expressão nuclear de Atg7 revelou mediana de 41,9% (*range*: 10,0% – 70,6%) nos COs associados à síndrome de Gorlin e de 23,6% (*range*: 7,8% – 30,3%) nos COs isolados primários, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ) (Figura 2A).

O percentual de imunoexpressão citoplasmática de Atg7 foi significativamente maior do que a imunoexpressão nuclear, tanto nos COs associados à síndrome de Gorlin ( $P < 0,001$ ) quanto nos COs isolados ( $P < 0,001$ ) (Figura 2A).

### *Imunoexpressão de p62*

Positividade citoplasmática e nuclear para p62 foi identificada em todos os casos de COs avaliados no presente estudo, com predomínio de imunorreatividade em camada parabasal/superficial do epitélio, tanto para as lesões isoladas quanto para as associadas à síndrome de Gorlin (Figura 1C,D) (Tabela 2).

No que se refere a expressão citoplasmática, foi constatada mediana de 29,9% (*range*: 4,7% – 81,8%) nos COs isolados e 28,0% (*range*: 6,4% – 51,9%) nos COs associados à síndrome de Gorlin, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P = 0,757$ ) (Figura 2B). Em relação à imunoexpressão nuclear de p62, foi identificada mediana de 50,2% (*range*: 26,4% – 65,5%) nos casos de COs associados à síndrome de Gorlin e mediana de 21,6% (*range*: 10,7% – 55,3%) nos COs isolados, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ) (Figura 2B).

O percentual de imunoexpressão nuclear de p62 foi significativamente maior do que a imunoexpressão citoplasmática nos COs associados à síndrome de Gorlin ( $P < 0,001$ ) (Figura 2B).



### *Imunoexpressão de p-mTOR*

Foram observadas expressões citoplasmáticas de p-mTOR em todos os casos de COs analisados, com predomínio de imunorreatividade na camada superficial do epitélio das lesões. Por sua vez, positividade nuclear para p-mTOR foi constatada em 15 (62,5%) casos de COs isolados e 14 (58,3%) casos de COs associados à síndrome de Gorlin (Figura 1E,F) (Tabela 2).

A análise da expressão citoplasmática de p-mTOR demonstrou mediana de 37,9% (*range*: 22,1% – 100,0%) nos COs associados à síndrome de Gorlin e de 29,1% (*range*: 8,4% – 100,0%) nos COs isolados, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P = 0,023$ ) (Figura 2C). No que se refere à expressão nuclear, foram constatados percentuais de positividade similares nos COs isolados (mediana: 4,6%; *range*: 0,0% – 83,6%) e nos COs associados à síndrome de Gorlin (mediana: 4,6%; *range*: 0,0% – 86,6%), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P = 0,717$ ) (Figura 2C).

O percentual de imunoexpressão citoplasmática de p-mTOR foi significativamente maior do que a imunoexpressão nuclear, tanto nos COs associados à síndrome de Gorlin ( $P < 0,001$ ) quanto nos COs isolados ( $P < 0,001$ ) (Figura 2C).

### **Discussão**

A autofagia é um sistema de catabolismo intracelular envolvido em várias funções fisiológicas e em processos patológicos,<sup>14,25</sup> mas o seu papel na patogênese ou na modulação do comportamento biológico de lesões odontogênicas é algo ainda incompletamente elucidado. Nesse contexto, os achados deste estudo sugerem uma importante participação das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) no desenvolvimento de COs e nas diferenças no comportamento biológico de COs isolados e associados à síndrome de Gorlin.

Todos os COs analisados neste estudo apresentaram imunorreatividade citoplasmática e nuclear para as proteínas Atg7 e p62, bem como positividade citoplasmática para p-mTOR. Estudos prévios descreveram altas expressões de proteínas relacionadas à autofagia em lesões odontogênicas, como COs,<sup>19</sup> ameloblastomas<sup>18,22</sup> e cistos radiculares.<sup>21</sup> Ao avaliarem cistos radiculares e COs, Li et al,<sup>19</sup> observaram maiores níveis de Beclina-1, Atg7, LC3 e p62 nos COs quando comparados aos cistos radiculares. Além disso, os autores revelaram uma distribuição parcialmente sincrônica das proteínas relacionadas à autofagia com os marcadores de proliferação celular (Ki-67) e de apoptose (Bcl-2) nos COs.<sup>19</sup> Para Li et al,<sup>19</sup> tais achados sugerem que o potencial de crescimento dos COs pode estar associado à ativação da autofagia nestas lesões.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os COs associados à síndrome de Gorlin apresentaram maior expressão das proteínas Atg7, p62 e p-mTOR em comparação aos COs isolados. Em relação à proteína Atg7, os COs associados à síndrome de Gorlin revelaram maior expressão citoplasmática ( $P < 0,001$ ), com predomínio de imunorreatividade em camada basal/parabasal. A proteína Atg7 apresenta importante papel na formação e alongamento do autofagossomo, através da conjugação do complexo Atg5-Atg12L e da lipidação da proteína LC3.<sup>15,26</sup> Nesse sentido, níveis citoplasmáticos aumentados de Atg7 sugerem ativação da autofagia.<sup>15,26</sup>

Diante destes achados, propõe-se que o comportamento biológico dos COs associados à síndrome de Gorlin pode ter relação com a atividade autofágica especialmente em células das camadas basal e parabasal, através da maior disponibilização de energia e nutrientes para essas células epiteliais mais profundas com alto potencial de crescimento. Sharp et al,<sup>22</sup> constataram que enxertos de células epiteliais derivadas de ameloblastomas apresentaram invaginações no tecido estromal e revelaram alta imunopositividade para marcadores autofágicos (LC3 e p62), principalmente na transição epitélio-mesenquimal. De acordo com esses autores, a ativação da autofagia pode dar suporte à sobrevivência celular e à capacidade proliferativa e infiltrativa das células epiteliais em regiões próximas à membrana basal.<sup>22</sup>

No que se refere a p-mTOR, quando comparados aos COs isolados, os casos associados à síndrome de Gorlin apresentaram maior expressão citoplasmática ( $P = 0,023$ ) com predomínio de imunorreatividade em camadas epiteliais superficiais. Considerando que mTOR atua na regulação negativa da autofagia, a expressão citoplasmática da sua forma fosforilada e ativada (p-mTOR) representa um importante marcador para a inibição do processo autofágico.<sup>14</sup> Diante do exposto, sugere-se que o comportamento biológico dos COs associados à síndrome de Gorlin provavelmente se relaciona com a inibição da autofagia nas camadas mais superficiais do epitélio, as quais apresentam um estado de maturação celular.

Ao avaliarem a autofagia na diferenciação epidérmica, Akinduro et al,<sup>27</sup> observaram que a expressão de mTOR nos ceratinócitos da camada granulosa atua na inibição dos demais marcadores autofágicos nesta camada mais superficial do epitélio. Para esses autores, na epiderme podem existir diferentes fluxos autofágicos entre proteínas expressas na camada basal, como Beclina1 e Atg5-Atg12, e os marcadores da camada granulosa, representados por LC3 e p62 que sofrem inibição por mTOR.<sup>27</sup> Um papel semelhante pode ser sugerido para essa proteína no revestimento epitelial dos COs, em virtude do padrão peculiar de imunorreatividade observado no presente estudo para p-mTOR especialmente nos casos associados à síndrome de Gorlin.

Tipicamente, as proteínas relacionadas a autofagia são avaliadas em citoplasma, mas ocasionalmente podem apresentar marcação no núcleo das células. O atual estudo revelou maior expressão nuclear de p62 ( $P < 0,001$ ) nos COs associados à síndrome de Gorlin em comparação aos isolados, principalmente na camada parabasal/superficial do epitélio de revestimento. A proteína p62 se transloca entre o núcleo e o citoplasma de forma rápida e constante, cujos níveis aumentados no núcleo podem sugerir alterações no reparo de DNA e instabilidade genômica das células.<sup>25,27</sup>

De acordo com Havaki et al,<sup>25</sup> a expressão nuclear de p62 está relacionada a funções não diretamente autofágicas, tais como o recrutamento de proteínas nucleares poliubiquinizadas e o envolvimento na degradação proteassomal neste compartimento celular. Além disso, sob condições de inibição da autofagia, a localização de p62 no núcleo leva ao sequestro e à função prejudicada da proteína RNF168, um componente da via de resposta ao dano ao DNA, resultando no recrutamento reduzido de proteínas de reparo de DNA.<sup>25</sup> Nesse sentido, a alta expressão nuclear de p62 pode contribuir no comportamento biológico de COs associados à síndrome de Gorlin através de outras funções não autofágicas, especialmente nas camadas mais superficiais que apresentaram, como característica, maior imunorreatividade ao inibidor autofágico p-mTOR.

As funções exatas de Atg7 no compartimento nuclear ainda não são completamente compreendidas, mas estudos têm enaltecido um provável papel na nucleofagia para esta proteína, atuando na lipidação de LC3 de modo semelhante ao que ocorre na macroautofagia citoplasmática.<sup>28</sup> No presente estudo, os COs associados à síndrome de Gorlin exibiram maior expressão nuclear de Atg7 ( $P < 0,001$ ) quando comparados aos COs isolados. Considerando que a translocação nuclear de Atg7 pode estar relacionada com a nucleofagia, é possível sugerir que nos COs associados à síndrome de Gorlin, a nucleofagia ocorra para manutenção da homeostase nuclear de células em constante proliferação.

Em seu recente estudo, Chen et al,<sup>29</sup> revelaram que o receptor *PTCH1* tem como função não canônica a inibição da autofagia, através da interação entre seu domínio citoplasmático C-terminal e a proteína Atg101, resultando no bloqueio do fluxo autofágico e no acúmulo de autofagossomo com conteúdo não degradado. Mutações somáticas no gene *PTCH1* em carcinomas basocelulares frequentemente resultam em truncamento prematuro do seu domínio C-terminal,<sup>30</sup> o que provavelmente compromete a inibição do fluxo autofágico através do receptor *PTCH1*. Em consonância a essa sugestão e considerando a importância das mutações no gene *PTCH1* para a patogênese dos COs, é possível ressaltar que nos COs

associados à síndrome de Gorlin espera-se que ocorram alterações no receptor *PTCH1*, e, consequentemente maior ativação do fluxo autofágico.

Em conclusão, o presente estudo sugere um importante papel da autofagia na patogênese de COs. O comportamento biológico dos COs associados à síndrome de Gorlin possivelmente tem relação com a ativação da autofagia nas camadas basal/parabasal do revestimento epitelial, representada pela alta expressão citoplasmática de *Atg7* e, ao mesmo tempo, pela menor positividade citoplasmática do inibidor autofágico p-mTOR. Ademais, a maior translocação nuclear da proteína p62, através de outras funções não autofágicas, pode influenciar nas diferenças de comportamento entre os COs associados à síndrome de Gorlin em comparação ao COs isolados. Os resultados deste estudo alicerçam a realização de novas investigações para avaliar o papel da autofagia na patogênese de lesões odontogênicas e para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas para os COs, com alvo na autofagia.

### **Agradecimentos**

Esse estudo recebeu recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Edital Universal; 427931/2016-9).

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesses.

### **Referências**

1. Speight P, Devilliers P, Li TJ, Odell EW, Wright JM. Odontogenic keratocyst. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO classification of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2017.
2. Cunha JF, Gomes CC, de Mesquita RA, Andrade Goulart EM, de Castro WH, Gomez RS. Clinicopathologic features associated with recurrence of the odontogenic keratocyst: a cohort retrospective analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016; 121: 629-635.
3. Qu J, Yu F, Hong Y, Guo Y, Sun L, Li X, Zhang J, Zhang H, Shi R, Chen F, Li T. Underestimated *PTCH1* mutation rate in sporadic keratocystic odontogenic tumors. *Oral Oncol.* 2015;51:40-45.
4. Onodera S, Saito A, Hasegawa D, Morita N, Watanabe K, Nomura T, Shibahara T, Ohba S, Yamaguchi A, Azuma T. Multi-layered mutation in hedgehog-related genes in Gorlin syndrome may affect the phenotype. *PLoS One.* 2017;15:e0184702.

5. Leonardi R, Matthews JB, Loreto C, et al. Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *Histol Histopathol.* 2013;28:1175-1184.
6. Hong YY, Yu FY, Qu JF, Chen F, Li TJ. Fibroblasts regulate variable aggressiveness of syndromic keratocystic and non-syndromic odontogenic tumors. *J Dent Res.* 2014; 93;904-910.
7. Hoyos Cadavid AM, Kaminagakura E, Rodrigues MFSD, Pinto CAL, Teshima THN, Alves FA. Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. *Clin Oral Investig.* 2019;23:153-159.
8. Nonaka CF, Cavalcante RB, Nogueira RL, de Souza LB, Pinto LP. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Arch Oral Biol.* 2012; 57:230-237.
9. de Brito Monteiro BV, Cavalcante RB, Maia Nogueira RL, da Costa Miguel MC, Weege Nonaka CF, da Silveira ÉJ. Participation of hMLH1, p63, and MDM2 proteins in the pathogenesis of syndromic and nonsyndromic keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120:52-57.
10. Leite RB, Cavalcante RB, Nogueira RLM, Souza LB, Pereira Pinto L, Nonaka CFW. Analysis of GLUT-1, GLUT-3, and angiogenic index in syndromic and non-syndromic keratocystic odontogenic tumors. *Braz Oral Res.* 2017;31:e34.
11. Ren XS, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Furubo S, Song JY, Nakanuma Y. Activation of the PI3K/mTOR pathway is involved in cystic proliferation of cholangiocytes of the PCK rat. *PLoS One.* 2014;9:e87660.
12. Chou LF, Cheng YL, Hsieh CY, Lin CY, Yang HY, Chen YC, Hung CC, Tian YC, Yang CW, Chang MY. Effect of trehalose supplementation on autophagy and cystogenesis in a mouse model of polycystic kidney disease. *Nutrients.* 2018; 11. pii: E42.
13. Masyuk AI, Masyuk TV, Lorenzo Pisarello MJ, Ding JF, Loarca L, Huang BQ, LaRusso NF. Cholangiocyte autophagy contributes to hepatic cystogenesis in polycystic liver disease and represents a potential therapeutic target. *Hepatology.* 2018;67:1088-1108.
14. Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;36:121-129.

15. Xiong J. Atg7 in development and disease: panacea or Pandora's Box? *Protein Cell*. 2015;6:722-734.
16. Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res*. 2012;66:457-462.
17. Chaisuparat R, Yodsanga S, Montaner S, Jham BC. Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116:336-342.
18. Okada M, Oikawa M, Miki Y, Shimizu Y, Echigo S, Takahashi T, Kumamoto H. Immunohistochemical assessment of ATG7, LC3, and p62 in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2014;43:606-612.
19. Li RF, Chen G, Zhao Y, Zhao YF, Liu B. Increased expression of autophagy-related proteins in keratocystic odontogenic tumours: its possible association with growth potential. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52:551-556.
20. Zhong WQ, Chen G, Zhang W, Xiong XP, Ren JG, Zhao Y, Liu B, Zhao YF. Down-regulation of connexin43 and connexin32 in keratocystic odontogenic tumours: potential association with clinical features. *Histopathology*. 2015;66:798-807.
21. Huang HY, Wang WC, Lin PY, Huang CP, Chen CY, Chen YK. The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions. *Int Endod J*. 2018;51 Suppl 2:e125-e145.
22. Sharp RC, Effiom OA, Dhingra A, Odukoya O, Olawuyi A, Arotiba GT, Boesze-Battaglia K, Akintoye SO. Enhanced basal autophagy supports ameloblastoma-derived cell survival and reactivation. *Arch Oral Biol*. 2019;98:61-67.
23. Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet*. 1993;30:460-464.
24. Brito LNS, de Lemos Almeida MMR, de Souza LB, Alves PM, Nonaka CFW, Godoy GP. Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *J Endod*. 2018;44:728-733.
25. Havaki S, Vlachou V, Zampetidis CP, Selemenakis P, Kotsinas A, Mavrogonatou E, Rizou SV, Kyrodimos E, Evangelou K, Kletsas D, Giatromanolaki A, Gorgoulis VG. Monitoring autophagy immunohistochemically and ultrastructurally during human head and neck carcinogenesis. relationship with the DNA damage response pathway. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: pii: E1920.

26. Subramani S, Malhotra V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep.* 2013; 14:143-151.
27. Akinduro O, Sully K, Patel A, Robinson DJ, Chikh A, McPhail G, Braun KM, Philpott MP, Harwood CA, Byrne C, O'Shaughnessy RFL, Bergamaschi D. Constitutive autophagy and nucleophagy during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol.* 2016; 136:1460-1470.
28. Luo M, Zhao X, Song Y, Cheng H, Zhou R. Nuclear autophagy: An evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. *Autophagy.* 2016; 12:1973-1983.
29. Chen X, Morales-Alcala CC, Riobo-Del Galdo NA. Autophagic flux is regulated by interaction between the C-terminal domain of PATCHED1 and ATG101. *Mol Cancer Res.* 2018;16:909-919.
30. Jayaraman SS, Rayhan DJ, Hazany S, Kolodney MS. Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *J Invest Dermatol* 2013; 154:213–220.

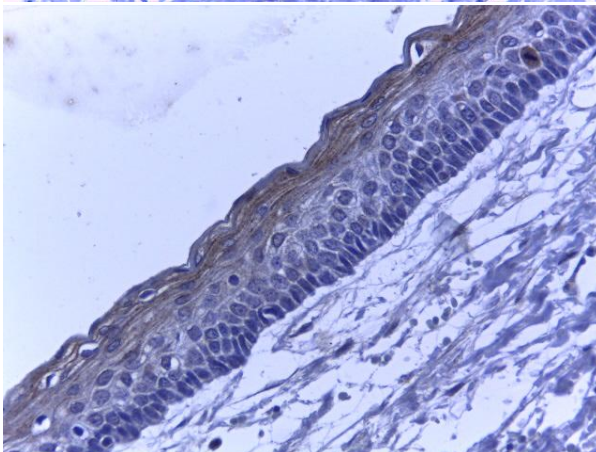
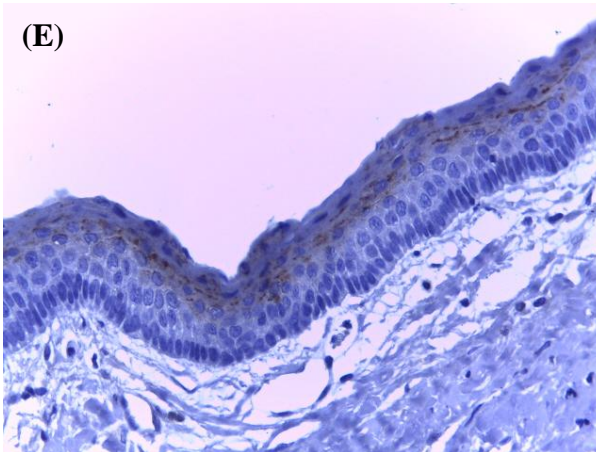
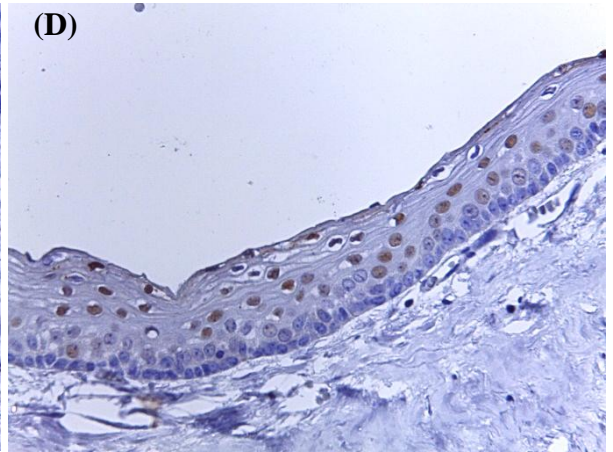
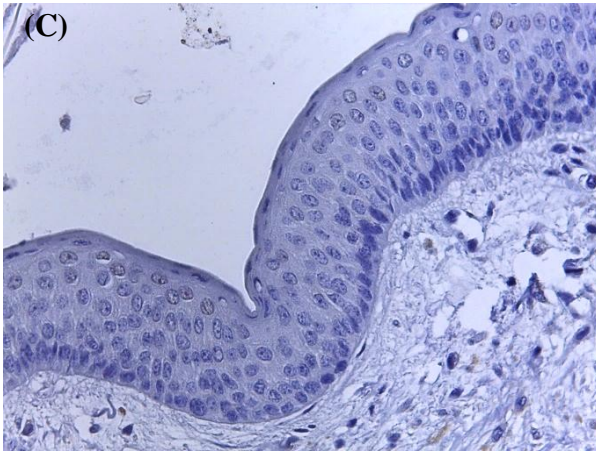
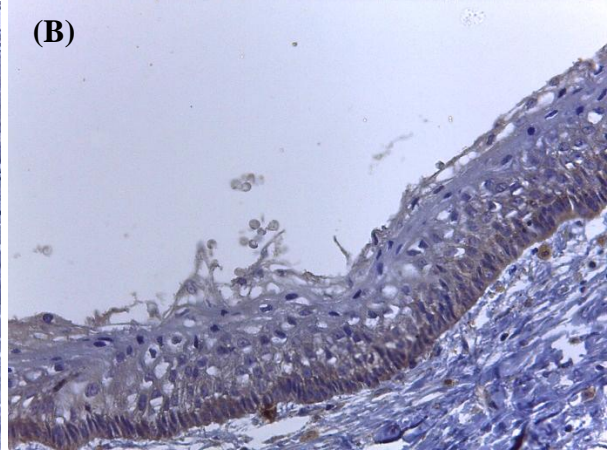
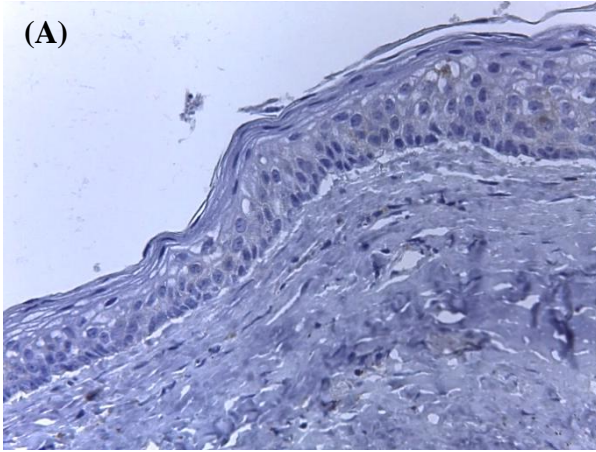
**Tabela 1.** Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

| <b>Especificidade</b> | <b>Referência</b> | <b>Fabricante</b> | <b>Diluição</b> | <b>Recuperação Antigênica</b>                      | <b>Incubação</b> |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------|----------------------------------------------------|------------------|
| Atg7                  | ab52472           | Abcam             | 1:750           | Tris-EDTA, pH 9,0<br><i>Steamer</i> , 90°C, 60 min | 60 minutos       |
| p62                   | ab56416           | Abcam             | 1:600           | Tris-EDTA, pH 9,0<br><i>Steamer</i> , 90°C, 60 min | 60 minutos       |
| p-mTOR                | #2976             | Cell<br>Signaling | 1:200           | Citrato, pH 6,0<br><i>Steamer</i> , 90°C, 60 min   | <i>Overnight</i> |

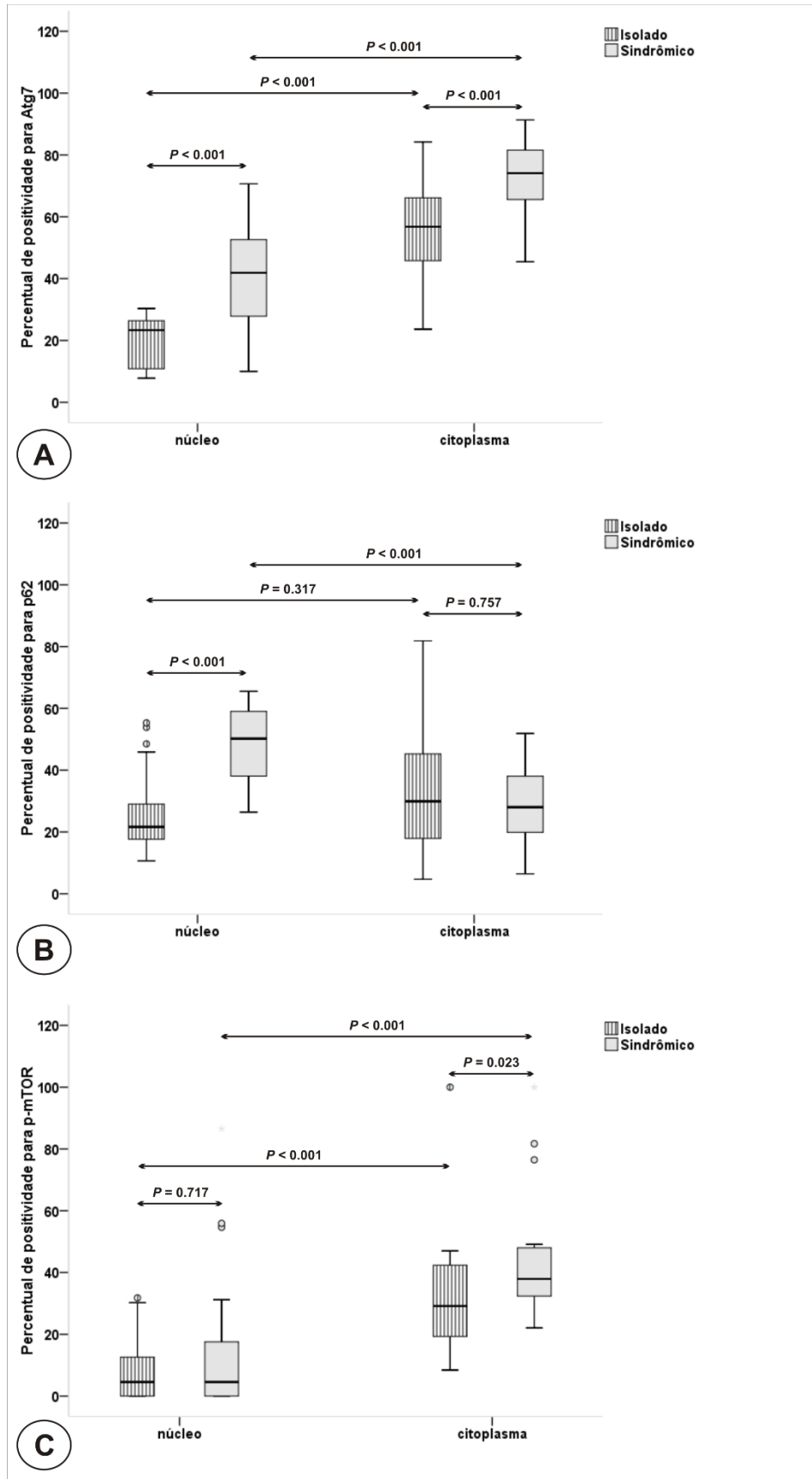


**Tabela 2.** Distribuição dos casos de CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para Atg7, p62 e p-mTOR no tecido epitelial.

| Proteínas/ predomínio | Grupos              |               |
|-----------------------|---------------------|---------------|
|                       | CO isolado primário | CO sindrômico |
|                       | n (%)               | n (%)         |
| <i>Atg7</i>           |                     |               |
| Basal/parabasal       | 19 (79,2%)          | 11 (45,8%)    |
| Parabasal/superficial | 0 (0,0%)            | 0 (0,0%)      |
| Superficial           | 0 (0,0%)            | 0 (0,0%)      |
| Todas as camadas      | 5 (20,8%)           | 13 (54,2%)    |
| <i>p62</i>            |                     |               |
| Basal/parabasal       | 0 (0,0%)            | 0 (0,0%)      |
| Parabasal/superficial | 19 (79,2%)          | 21 (87,5%)    |
| Superficial           | 0 (0,0%)            | 0 (0,0%)      |
| Todas as camadas      | 5 (20,8%)           | 3 (12,5%)     |
| <i>p-mTOR</i>         |                     |               |
| Basal/parabasal       | 4 (16,7%)           | 0 (0,0%)      |
| Parabasal/superficial | 3 (12,5%)           | 4 (16,7%)     |
| Superficial           | 15 (62,5%)          | 12 (50,0%)    |
| Todas as camadas      | 2 (8,3%)            | 8 (33,3%)     |



**Figura 1.** Imunoexpressão de Atg7 em camada basal/ parabasal em CO isolado (A) e em CO associado à síndrome de Gorlin (B) (*Reveal*, 400×). Expressão de p62 em camada parabasal/superficial em CO isolado (C) e em CO associado à síndrome de Gorlin (D) (*Reveal*, 400×). Imunoexpressão de p-mTOR em camada superficial em CO isolado (E) e em CO associado à síndrome de Gorlin (F) (*Reveal*, 400×).



**Figura 2.** Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade (citoplasma e núcleo) para Atg7, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de COs. (A) Imunoexpressão de Atg7; (B) Imunoexpressão de p62; (C) Imunoexpressão de p-mTOR.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de COs isolados e associados à síndrome Gorlin compartilharem uma patogênese similar, caracterizada por mutações no gene *PTCH1*, ativação da via de sinalização SHH e estímulo à proliferação de remanescentes da lâmina dentária, estudos sugerem um comportamento biológico mais agressivo para os casos síndrômicos. Embora diversas pesquisas tenham sido realizadas, as razões para tais diferenças no comportamento dessas lesões permanecem incompletamente elucidadas.

Na patogênese de lesões císticas, estudos têm destacado a potencial participação da autofagia, um sistema de catabolismo intracelular que envolve uma série de proteínas e moléculas, especialmente Atg7, p62 e p-mTOR. Apesar do seu papel em diversos processos fisiológicos e patológicos, pouco se sabe sobre o envolvimento da autofagia no desenvolvimento dos COs.

Os resultados da presente pesquisa sugerem o envolvimento da autofagia na patogênese dos COs. Nesse contexto, a ativação da autofagia na camada basal/parabasal do revestimento epitelial de COs associados à síndrome de Gorlin, representada pela alta expressão citoplasmática de Atg7 e pela menor imunopositividade citoplasmática do inibidor autofágico p-mTOR nesta camada, pode contribuir para o comportamento biológico distinto entre os grupos de COs avaliados. Além disso, a maior translocação nuclear da proteína p62 poderia contribuir para o comportamento dos COs associados à síndrome de Gorlin, possivelmente por funções não diretamente relacionadas à autofagia, como o recrutamento de proteínas nucleares poliubiquinizadas ou de proteínas envolvidas no reparo de DNA.

Em conjunto, os resultados deste estudo alicerçam a realização de novas investigações para avaliar o papel dessas proteínas e da autofagia na patogênese de COs e de outras lesões odontogênicas. Ademais, os achados encontrados subsidiam estudos futuros para desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas para os COs, com alvo na autofagia.

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- AKBARI, M. *et al.* Basal cell nevus syndrome (Gorlin syndrome): genetic insights, diagnostic challenges, and unmet milestones. **Pathophysiology**, v.25, n. 2, p.77-82, 2018.
- AKINDURO, O. *et al.* Constitutive autophagy and nucleophagy during epidermal differentiation. **J Invest Dermatol**, v. 136, p. 1460-1470, 2016.
- AMORIM, R. F. *et al.* Immunohistochemical assessment of extracellular matrix components in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. **Oral Dis**, v. 10, p. 265-270, 2004.
- ANTONOGLOU, G. N. *et al.* Non-syndromic and syndromic keratocystic odontogenic tumors: systematic review and meta-analysis of recurrences. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, p. e364-e371, 2014.
- APPUHAMY, J. A. *et al.* Hanigan Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells. **J Dairy Sci**, v. 97, p. 419-429, 2014.
- BRITO, L. N. S. *et al.* Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **J Endod**, v. 44, p. 728-733, 2018.
- CHAISUPARAT, R. *et al.* Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and ameloblastomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 116, p. 336-342, 2013.
- CHEN, X. *et al.* autophagic flux is regulated by interaction between the c-terminal domain of PATCHED1 and ATG101. **Mol Cancer Res**, v. 16, p. 909-919, 2018.
- CHOU, L.F. *et al.* Effect of trehalose supplementation on autophagy and cystogenesis in a mouse model of polycystic kidney disease. **Nutrients**, v. 11, p. E42, 2018.
- CHU, S. C. *et al.* Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation- dependent apoptosis and lc3-ii activation-dependent Autophagy. **Plos One**, v. 9, p. e101579, 2014.
- CUNHA, J.F. *et al.* Clinicopathologic features associated with recurrence of the odontogenic keratocyst: a cohort retrospective analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 121, p. 629-635, 2016.
- DE BRITO MONTEIRO, B. V. *et al.* Participation of hMLH1, p63, and MDM2 proteins in the pathogenesis of syndromic and nonsyndromic keratocystic odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 120, n. 1, p. 52-57, 2015.
- DUNLOP, E. A.; TEE, A. R. MTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 121-129, 2014.
- EVANS, D. G. *et al.* Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. **J. Med Genet**, v. 30, n. 6, p. 460-464, 1993.



- FIGUEROA, A. *et al.* Keratocystic odontogenic tumor associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: similar behavior to sporadic type? **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 142, n. 2, p. 179-183, 2010.
- HANSEN, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; WALKER D.W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 19, n.9, p. 579-593, 2018.
- HAVAKI, S. *et al.* Monitoring autophagy immunohistochemically and ultrastructurally during human head and neck carcinogenesis. Relationship with the DNA damage response pathway. **Int J Mol Sci**, v. 18, pii: E1920, 2017.
- HONG, Y. Y. *et al.* Fibroblasts regulate variable aggressiveness of syndromic keratocystic and non-syndromic odontogenic tumors. **J Dent Res**, v.93, p. 904-910, 2014.
- HOYOS CADAVID, A.M. *et al.* Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. **Clin Oral Investig**, v. 23, p. 153-159, 2019.
- HU, S. *et al.* Transcriptome Variability in Keratocystic Odontogenic Tumor Suggests Distinct Molecular Subtypes. **Sci Rep**, v. 12, n. 6, p. 24236, 2016.
- HUANG, H.Y. *et al.* The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions. **Int Endod J**, v. 51, p. e125-e145, 2018.
- JAYARAMAN, S.S. *et al.* Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. **J Invest Dermatol**, v. 154, p. 213–220, 2013.
- JING, Z. *et al.* Interaction of autophagy with microRNAs and their potential therapeutic implications in human cancers. **Cancer Lett**, v. 356, p. 332-338, 2015.
- JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. **Methods**, v. 75, p. 13-18, 2015.
- KADLUB, N. *et al.* PTCH1 mutation and local aggressiveness of odontogenic keratocystic tumors in children: is there a relationship? **Hum Pathol**, v. 44, n. 6, p. 1071–1078, 2013.
- KAHRAMAN, D.; GUNHAN, O.; CELASUN, B. A series of 240 odontogenic keratocysts: Should we continue to use the terminology of ‘keratocystic odontogenic tumor’ for the solid variant of odontogenic keratocyst? **J Craniomaxillofac Surg**, v. 6, p. 942-946, 2018.
- KINARD, B. *et al.* How well do we manage the odontogenic keratocyst? A multicenter study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 127, p. 282-288, 2019.
- KOMATSU, M.; KAGEYAM, S.; ICHIMURA, Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. **Pharmacol Res**, v. 66, p. 457-462, 2012.
- LEITE, R. B. *et al.* Analysis of GLUT-1, GLUT-3, and angiogenic index in syndromic and non-syndromic keratocystic odontogenic tumors. **Braz Oral Res**, v.31, p. e34, 2017.
- LEONARDI, R. *et al.* MMP-13 expression in keratocyst odontogenic tumor associated with NBCCS and sporadic keratocysts. **Oral Dis**, v. 16, n. 8, p.795-800, 2010.

- LEONARDI, R. *et al.* Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. **Histol Histopathol**, v. 28, n. 9, p. 1175-1184, 2013.
- LI, R. F. *et al.* Increased expression of autophagy-related proteins in keratocystic odontogenic tumours: its possible association with growth potential. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 52, p. 551-556, 2014.
- LUO, M. *et al.* Nuclear autophagy: An evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. **Autophagy**, v. 12, p. 1973-1983, 2016.
- MASYUK, A.I. *et al.* Cholangiocyte autophagy contributes to hepatic cystogenesis in polycystic liver disease and represents a potential therapeutic target. **Hepatology**, v. 67, p. 1088-1108, 2018.
- NETEA-MAIER, R. T. *et al.* Autophagy in thyroid cancer: present knowledge and future perspectives. **Front Endocrinol. (Lausanne)**, v. 18, p. 22, 2015.
- NONAKA, C. F. *et al.* Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. **Arch Oral Biol**, v.57, n. 3, p. 230-237, 2012.
- OKADA, M. *et al.* Immunohistochemical assessment of ATG7, LC3, and p62 in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, v. 43, p. 606-612, 2014.
- ONODERA, S. *et al.* Multi-layered mutation in hedgehog-related genes in Gorlin syndrome may affect the phenotype. **PLoS One**, v. 15, p. e0184702, 2017.
- QU, J. *et al.* Underestimated PTCH1 mutation rate in sporadic keratocystic odontogenic tumors. **Oral Oncol**, v. 51, p. 40-45, 2015.
- REN, X.S. *et al.* Activation of the PI3K/mTOR pathway is involved in cystic proliferation of cholangiocytes of the PCK rat. **PLoS One**, v. 9, p. e87660, 2014.
- SAIYIN, W. *et al.* Sequential release of autophagy inhibitor and chemotherapeutic drug with polymeric delivery system for oral squamous cell carcinoma therapy. **Mol Pharm**, v. 11, p. 1662-1675, 2014.
- SHARP, R.C. *et al.* Enhanced basal autophagy supports ameloblastoma-derived cell survival and reactivation. **Arch Oral Biol**, v. 98, p. 61-67, 2019.
- SPEIGHT, P. *et al.* Odontogenic keratocyst. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. **WHO classification of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press; 2017.
- SUBRAMANI, S.; MALHOTRA, V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. **EMBO Rep**, v. 14, n.2, p. 143-151, 2013.
- XIONG, J. Atg7 in development and disease: panacea or Pandora's Box? **Protein Cell**, v. 6, p. 722-734, 2015.

ZHONG, W. Q. et al. Down-regulation of connexin43 and connexin32 in keratocystic odontogenic tumours: potential association with clinical features. **Histopathology**, v. 66, p. 798-807, 2015.

ZHU, P. *et al.* Autophagy activators suppress cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. **Hum Mol Genet**, v. 26, p. 158-172, 2017.







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

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



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA EM CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS PRIMÁRIOS, RECORRENTES E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN

**Pesquisador:** Cassiano Francisco Weege Nonaka

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 73520017.2.0000.5187

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

**Patrocinador Principal:** CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.295.348

#### Apresentação do Projeto:

Projeto encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba para análise e parecer com fins de elaboração de trabalho de pesquisa junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar e comparar a expressão imunoistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia em COs isolados e associados à síndrome de Gorlin.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme a RESOLUÇÃO 466/12/CNS/MS, Item V, toda pesquisa com seres humanos envolve riscos com graus variados. Para este estudo segundo o pesquisador responsável junto a Plataforma Brasil: “Uma vez que a coleta de dados deste estudo será do tipo documental, através da extração de informações em fichas clínicas, bem como utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivo, os riscos potenciais implicados na participação nesta pesquisa não estão ao alcance de percepções. Logo, para o presente estudo, não há riscos previsíveis aos sujeitos envolvidos. Não há benefícios diretos para os sujeitos da pesquisa. Porém, ao permitir que os materiais biológicos das lesões sejam incluídos neste estudo, os participantes contribuirão para o

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

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



Continuação do Parecer: 2.295.348

esclarecimento dos possíveis mecanismos responsáveis pelas diferenças no comportamento biológico entre COs isolados e associados à síndrome de Gorlin, bem como para a eventual identificação de alvos potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para estas lesões”.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A população do estudo será constituída por todos os casos de COs diagnosticados e arquivados nos Laboratórios de Patologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Ao analisar os documentos necessários para a integração do protocolo científico, encontramos os documentos necessários e obrigatórios, não havendo pendências com relação a estes.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O referido estudo ao fim que se destina, segue sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                      | Postagem               | Autor                           | Situação |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_857142.pdf | 09/08/2017<br>11:11:20 |                                 | Aceito   |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | Termo_Autorizacao_Institucional.pdf          | 09/08/2017<br>11:10:16 | Cassiano Francisco Weege Nonaka | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto_CEP_Universal.pdf                    | 09/08/2017<br>11:09:47 | Cassiano Francisco Weege Nonaka | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Dispensa_TCLE.pdf                            | 09/08/2017<br>11:07:54 | Cassiano Francisco Weege Nonaka | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | Folha_Rosto.pdf                              | 09/08/2017<br>11:07:23 | Cassiano Francisco Weege Nonaka | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

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



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



Continuação do Parecer: 2.295.348

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPINA GRANDE, 25 de Setembro de 2017

---

**Assinado por:**  
**Marconi do Ó Catão**  
**(Coordenador)**

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

**ANEXO B** – Normas para submissão de artigos ao periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine*

## **Author Guidelines**

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

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

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

### **1. GENERAL**

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

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

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

## 2. ETHICAL GUIDELINES

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

### 2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

### 2.2. Ethical Approvals

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

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

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have

the rights we require please provide a signed consent form in all instances. Consent Form Template.

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

### **2.3 Clinical Trials**

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

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

### **2.4 Conflict of Interest**

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

### **2.5 Appeal of Decision**

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

### **2.6 Permissions**

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

### **2.7 Copyright Assignment**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the

Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### **For authors signing the copyright transfer agreement**

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

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

### **For authors choosing Online Open**

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

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

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

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

## **2.8 OnlineOpen**

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### 3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

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

#### 3.1. Getting Started

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

- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.

- If you are registering as new user.

- After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.

- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'

- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.

- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

- Log-in and select 'Author Centre'.

#### 3.2. Submitting Your Manuscript

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

- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.

- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.

- You are required to upload your files.

- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.

- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.

- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### **3.3. Manuscript Files Accepted**

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

### **3.4. Blinded Review**

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

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

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

### **3.6. E-mail Confirmation of Submission**

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

### **3.7. Manuscript Status**

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

### **3.8. Submission of Revised Manuscripts**

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

### **3.9. Data Protection**

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the

operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

#### 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

**Original Research Articles:** of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. 3,000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 30 references

**Review Papers:** *Journal of Oral Pathology & Medicine* commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review. 3,000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 50 references

##### *Systematic reviews:*

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

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



- Provide recommendations for future researches

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

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

**Brief Reports:** Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. 1,000 words maximum.

**Letters to the Editor:** Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in *Journal of Oral Pathology & Medicine* or they may raise new issues, but should have important implications. 750 words maximum. One figure or table, 5 references.

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1. Page Charge

Articles exceeding 8 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

### 5.2. Format Language:

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

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

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

### 5.3. Structure

All papers submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

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

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

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

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

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

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

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

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

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National

Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

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

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

**Discussion:** Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

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

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

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

#### 5.4. References

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

- If there are more than 6 author names in a reference then first three author names are retained with ‘et al.’ and et al. is in roman.
- Article title in roman and sentence case.
- Journal title in italics and abbreviated with period at the end of the title only and not for all abbreviated terms.

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

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

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

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

Book: 2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p. Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

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

### **5.5. Tables, Figures and Figure Legends Tables:**

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

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

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

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

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

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

## **6. AFTER ACCEPTANCE**

### **6.1 Proofs**

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

### **6.2 Supporting Information**

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

### **6.3 Early View**

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

### **6.4 Offprints**

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

### **6.5 Author Services**

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production

process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript.

Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

## **6.6 Video Abstracts**

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it at [www.wileyauthors.com/videoabstracts](http://www.wileyauthors.com/videoabstracts). If you have any questions, please direct them to [videoabstracts@wiley.com](mailto:videoabstracts@wiley.com).