



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

**IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA EM
LESÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS DE CÉLULAS GIGANTES**

ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE

CAMPINA GRANDE – PB

2023

ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE

**IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA EM
LESÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS DE CÉLULAS GIGANTES**

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

Área de concentração: Clínicas Odontológicas

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

CAMPINA GRANDE – PB

2023

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.

A553i Andrade, Allany de Oliveira.
Imunoexpressão de proteínas relacionadas à autofagia em lesões centrais e periféricas de células gigantes [manuscrito] / Allany de Oliveira Andrade. - 2023.
103 p. : il. colorido.

Digitado.

Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS. "

1. Células gigantes. 2. Lesão periférica de células gigantes. 3. Lesão central de células gigantes. 4. Autofagia. 5. Imuno-histoquímica. I. Título

21. ed. CDD 571.6

ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE

**IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA EM
LESÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS DE CÉLULAS GIGANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Odontologia.

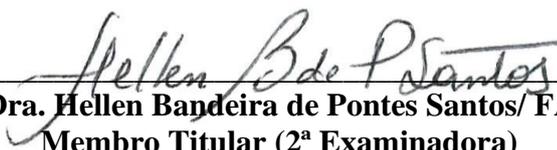
Área de concentração: Clínicas Odontológicas

DATA DA DEFESA: 19/04/2023

BANCA EXAMINADORA



**Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro/ UFCG
Membro Titular (1ª Examinadora)**



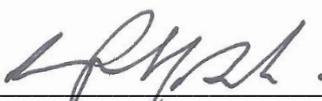
**Profa. Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos/ FACENE
Membro Titular (2ª Examinadora)**



**Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves/ UEPB
Membro Titular (3ª Examinadora)**



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



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

*Dedico essa tese a minha amada mãe **Denise de Oliveira Andrade**, minha maior incentivadora e fonte de inspiração. A sua força me contagia e tudo o que quero é ser como você. A senhora, todo o meu amor, admiração e devoção. Desejo que a minha existência seja para honrar o amor de Deus em nossas vidas.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, quem me moldou e incentivou durante cinco anos de orientação (mestrado e doutorado). Foi o senhor que me mostrou como superar os meus limites, a confiar na minha capacidade, e o mais importante, me fez amadurecer não somente como aluna, professora e pesquisadora, mas como pessoa. Agradeço por cada vez que me autossabotei e o senhor me mostrou a minha força. Agradeço a confiança depositada, o ombro amigo para os meus momentos de desabafo e por tudo o que o senhor representa para mim como pessoa, professor e orientador. Desejo que Deus abençoe a sua vida, saúde e família e que no seu caminhar encontre pessoas que somam e que saibam aproveitar o que todos admiram na sua trajetória como orientador: sua inteligência, dedicação à pesquisa e o compromisso com seu o trabalho. Por fim, encerro o ciclo da pós-graduação com a certeza de ter fidelizado uma parceria com uma pessoa brilhante com quem posso contar, pois o senhor sempre foi para mim esse suporte. Saiba que a ajuda é recíproca, sempre que for necessária, estarei à sua disposição. Ao senhor, meu respeito e eterna admiração.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que trouxe ao meu coração o sonho da docência e me conferiu disposição e vontade para que fosse concretizada essa realização.

À **Nossa Senhora da Conceição**, a quem consagrei minha família e vida.

À minha **mãe, Denise de Oliveira Andrade**, minha maior fonte de inspiração e incentivo para conseguir os meus objetivos. A oração de uma mãe é poderosa, sei que muito da minha força veio dos seus joelhos dobrados.

Ao meu amoroso **esposo, Rafael Gomes de Lucena**, por toda a sua compreensão com minhas ausências e por ter me apoiado nos meus projetos. Obrigada por tanto me acolher, abraçar os meus sonhos e se colocar em segundo plano nas minhas prioridades nesse período, compreendendo que seria para o meu crescimento e conseqüentemente para melhoria das nossas vidas. Sem você, sem o seu apoio e sem a sua felicidade com as minhas conquistas, nada faria sentido.

Aos meus anjos que olham por mim todos os dias do céu (*in memoriam*), meu pai **Aldemir Ferreira de Andrade** e meus avós maternos, **Teodora Pastora de Oliveira** e **João Sabino de Oliveira**, minha eterna saudade. Apesar da ausência física, os seus ensinamentos e afetos estão eternizados em meu coração.

A todos os meus **familiares**, em especial ao meu **irmão, Allan de Oliveira Andrade**, **cunhada, Maria Valdenia Felix Andrade** que me apoiaram e torceram por esse momento, minha eterna gratidão.

Aos meus **sogros, Mariedna Gomes de Lucena** e **João Bosco de Lucena** a quem guardo um imenso carinho e respeito, obrigada por tanto me acolher e torcer pelos meus sonhos.

Aos meus afilhados, **Jhoan Kéven** e **Melanie Lucena** (meu pão de queijo), por trazer esperança e felicidade aos meus dias.

As minhas amigas, **Ana Vitoria Luna, Bianca Cabral, Kamilly Frazão, Patrícia Ricássio, Mariana Felix, Raphaela Barbosa, Dayanna Kelly, Kevilin Vitória e Ilka Micheli**, eternas confidentes e incentivadoras do meu progresso, agradeço a Deus por tê-las em minha vida.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação, especialmente da minha **turma de Doutorado 2020.2**, pela convivência e troca de conhecimentos durante as disciplinas.

Ao professor **Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, por sua leveza como educador e por ter aberto as portas da sua casa quando foi necessária. O senhor para mim é um exemplo de superação, elegância e competência. Obrigada por ter feito parte do meu processo de aprendizagem desde a graduação sendo fonte de inspiração para quem almeja um futuro melhor através dos estudos. Saiba que minha admiração por sua pessoa transcende os muros de uma instituição. Que Deus abençoe sua existência e seus passos onde o senhor for.

À professora **Dra. Pollianna Muniz Alves**, obrigada por ser fonte de inspiração de mulheres pesquisadoras, empoderadas, seguras e fortes. Todo o meu respeito e admiração por seu trabalho, por sua figura feminina de competência e pelos momentos compartilhados no laboratório. Obrigada por todos esses anos de ensinamentos. Que Deus abençoe sua saúde e sua família.

À professora **Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, alegro-me em ter uma professora que acompanhou meu processo de crescimento desde a graduação, banca de mestrado até a finalização do doutorado. Obrigada por ser fonte de inspiração de mulheres fortes e extremadamente competentes. Gratidão por fazer desse momento tão importante.

À professora **Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos**, que mesmo sem conhecer pessoalmente, já era fonte de inspiração para seguir desde quando ingressei no mestrado. Sempre escutei falar da sua competência, dedicação ao laboratório e o quanto o professor te admirava, logo tinha muito a aprender com o seu exemplo. Obrigada por fazer parte do momento de defesa e fazer parte da finalização desse ciclo.

Aos meus eternos professores da graduação **Dr. Rodrigo Gadelha Vasconcelos, Dr. Marcelo Gadelha Vasconcelos e Dr. Edson Vasconcelos Peixoto**, os primeiros mestres que

oportunizaram o desenvolvimento de projetos que me possibilitaram galgar a carreira acadêmica. Guardo com muito carinho toda a confiança, parceria e conselhos que foram dados. Gratidão por terem acreditado em mim.

A professora **Dra. Katia Simone Alves dos Santos**, por seu acolhimento no estágio em docência e na clínica integrada em pesquisa com a área de concentração na disciplina de endodontia. No meu processo de autoconhecimento, a senhora foi essencial para viabilizar a concretização da minha área de atuação profissional. Nesse período pude me encontrar como professora. Gratidão por toda credibilidade com o meu trabalho e confiança depositada.

A professora **Dra. Diana Santana de Albuquerque**, dentre muitos docentes que me inspiram, a senhora tem um lugar especial. Obrigada por sua doação ao ensino de qualidade. Hoje, sou apaixonada pela minha especialização graças ao seu amor pela endodontia que é inspirador. Gratidão a Deus por sua existência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e colaboradores (Prof. **Dr. Alessandro Leite Cavalcanti**, Profa. **Dra. Ana Flávia Granville-Garcia**, Prof. **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, Profa. **Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes**, Profa. **Dra. Daniela Pita de Melo**, Profa. **Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa**, Profa. **Dra. Jozinete Vieira Pereira**, Prof. **Dr. Manuel Antonio Górdon-Núñez**, Profa. **Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, Profa. **Dra. Patrícia Meira Bento**, Profa. **Dra. Pollianna Muniz Alves**, Profa. **Dra. Renata Cardoso Rocha Madruga**, Profa. **Dra. Andreza Cristina de Lima Targino Massoni** e Prof. **Dr. Sérgio d'Ávila Lins Bezerra Cavalcanti**), que com vontade, sabedoria e competência compartilharam conosco seus conhecimentos tornando-nos eternos aprendizes da ciência.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta tese Profa. **Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos**, Profa. **Dra. Pollianna Muniz Alves**, Profa. **Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, Prof. **Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez** Profa. **Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes** e Prof. **Dr. Gustavo Pina Godoy** pelo aceite em participação desta banca, pelo empenho e dedicação na leitura deste trabalho e, desde já, pelas contribuições que serão apresentadas.

Às **técnicas de laboratório Ana Luzia de Araújo Batista e Denize Núbia Souza** por todo auxílio, amizade e carinho. Especialmente Denize, obrigada por todos os momentos de gargalhadas compartilhadas que fizeram da convivência no laboratório mais reconfortante e alegre. A sua ajuda foi imprescindível para realização desta pesquisa e outros projetos, muito obrigada por toda a dedicação com o trabalho e o acolhimento que tive comigo.

A todos os amigos que fizeram parte das atividades do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB: Em especial, a **Emanuene Galdino, Luana Sena, Catarina Monteiro e Christany Rodrigues** que estiveram ao meu lado me fortalecendo e sendo amigas imprescindíveis para a concretização desse período. Gratidão a todos os amigos do laboratório pelos bons momentos vivenciados. Foi estabelecido nesse ambiente de trabalho uma parceria de muita união e colaboração. Agradeço em especial à **Raelly Lima, Vanessa Alves e Wliana Pontes** pela estimada ajuda com a execução da imunoistoquímica da minha pesquisa. Sobretudo, agradeço a **Elton Fernandes**, por ter abraçado esse projeto como seu e ter me ajudado com tanto esmero e dedicação, minha eterna gratidão.

Ao *Team Nonaka* composto por **Amanda Lira, Daniella Lucena, Vanessa Alves, Wliana Pontes, Christany Rodrigues e Elton Fernandes**, agradeço a parceria, amizade e por todos os momentos compartilhados.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, especialmente **Ahyanna Nóbrega e Jocelma** pela compreensão e dedicação ao serviço, e **Dione**, pelo exemplo de esforço e alegria.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por auxílios financeiros que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Ao **Centro Integrado de Diagnóstico e Tratamento das Lesões da Região Craniofacial**, unidade I do **Centro Integrado Multiusuário de Referência em Saúde da Paraíba**, por disponibilizar a infraestrutura e equipamentos necessários ao escaneamento das lâminas histológicas em alta resolução.

Por fim, à **Universidade Estadual da Paraíba** por ter me oportunizado crescimento pessoal e profissional através do estudo. Como aluna de escola pública em todo o meu ensino

básico, poder ter acesso ao ensino superior de qualidade de forma gratuita foi a oportunidade que precisava para desenvolver o meu potencial. A educação transforma vidas, essa instituição mudou a minha. Tenho muito orgulho de ser fruto da UEPB.

RESUMO

Lesões centrais de células gigantes (LCCG) e lesões periféricas de células gigantes (LPCG) apresentam características histopatológicas similares, com destaque para a presença de células gigantes multinucleadas (CGM) semelhantes a osteoclastos e células mononucleadas (CM). Apesar disso, essas lesões exibem diferenças importantes em termos de etiopatogênese e comportamento biológico. Apesar disso, essas lesões exibem diferenças importantes em termos de etiopatogênese e comportamento biológico. A despeito de intensa investigação científica, os mecanismos responsáveis por tais diferenças permanecem incompletamente compreendidos. Em processos fisiológicos e patológicos que envolvem a modulação das funções de osteoclastos e osteoblastos, pesquisas têm enaltecido a importância da autofagia. A autofagia consiste em um mecanismo intracelular catabólico, direcionado à sobrevivência celular, que envolve a participação de diversas moléculas, com destaque para as proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR. Apesar dos relevantes papéis da autofagia em diversos processos patológicos, incluindo doenças ósseas metabólicas e degenerativas, pouco se sabe sobre sua participação na patogênese de lesões de células gigantes. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a imunoposição de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR) em LPCG e LCCG. A amostra foi constituída por 10 casos de LPCG, 10 casos de LCCG não agressiva e 10 casos de LCCG agressiva. No estudo clínico, as LCCG foram classificadas em não agressivas ou agressivas, com base nos critérios descritos por Chuong *et al.* (1986). No estudo imunohistoquímico, foram estabelecidos os percentuais de CM, CGM canibais (CGMc) e CGM não canibais (CGMnc) positivas (citoplasma e núcleo) em 5 campos de maior imunorreatividade (400x) aos anticorpos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio dos testes de Mann-Whitney e de correlação de Spearman ($p < 0,05$). Foi constatada expressão citoplasmática de Atg7, LC3A, LC3B e p62 em todos os grupos de lesões e tipos celulares analisados, com altos percentuais medianos de positividade. Nas CM, LCCG agressivas apresentaram maior expressão de Atg7 em comparação a LCCG não agressivas ($p = 0,041$). Para LC3A, LCCG não agressivas demonstraram menor imunorreatividade em CM quando comparadas às LPCG ($p = 0,041$) e LCCG agressivas ($p = 0,049$). Comparadas às LCCG não agressivas, as LPCG exibiram maiores imunoposições de LC3B e p62, tanto em CM ($p = 0,007$; $p = 0,034$, respectivamente) quanto em CGMnc ($p = 0,034$; $p = 0,034$, respectivamente). Todos os grupos apresentaram baixos percentuais medianos de positividade para p-mTOR, tanto em CM quanto em CGM. Em comparação às LCCG não agressivas, as LPCG apresentaram maior expressão de p-mTOR em CGMc ($p = 0,036$). Em relação à expressão nuclear de Atg7, LC3A e p-mTOR, todos os grupos apresentaram baixos percentuais medianos

de positividade. Nas CM, LCCG agressivas demonstraram maior positividade para Atg7 em comparação às LPCG ($p=0,005$). Para LC3A, as LPCG apresentaram maior expressão nuclear em CGMc em comparação às LCCG agressivas ($p=0,036$). Por sua vez, em todos os grupos de lesões e tipos celulares, constatou-se maior expressão nuclear de LC3B e p62 em comparação às demais proteínas relacionadas à autofagia. Nas CM, LPCG exibiram maior imunorreatividade para LC3B quando comparadas às LCCG não agressivas ($p=0,049$). Em todos os grupos, foram constatadas correlações estatisticamente significativas entre as imunoexpressões de proteínas relacionadas à autofagia ($p<0,05$). Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem um potencial envolvimento da autofagia na patogênese das LPCG e LCCG. As diferenças no comportamento biológico de LCCG agressivas e não agressivas, no entanto, parecem não estar relacionadas a esse mecanismo intracelular catabólico. Além disso, por meio de funções nucleares não necessariamente relacionadas à autofagia, as proteínas LC3B e p62 podem contribuir para o desenvolvimento das LPCG e LCCG.

Palavras-chave: Células gigantes; Lesão periférica de células gigantes; Lesão central de células gigantes; Autofagia; Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Central giant cell lesions (CGCL) and peripheral giant cell lesions (PGCL) have similar histopathological characteristics, with emphasis on the presence of multinucleated giant cells (MGC) similar to osteoclasts and mononuclear cells (MC). Despite this, these lesions exhibit important differences in terms of etiopathogenesis and biological behavior. Despite intense scientific investigation, the mechanisms responsible for such differences remain incompletely understood. In physiological and pathological processes that involve the modulation of osteoclast and osteoblast functions, research has highlighted the importance of autophagy. Autophagy consists of a catabolic intracellular mechanism, aimed at cell survival, which involves the participation of several molecules, with emphasis on Atg7, LC3A, LC3B, p62 and p-mTOR proteins. Despite the relevant roles of autophagy in several pathological processes, including metabolic and degenerative bone diseases, little is known about its participation in the pathogenesis of giant cell lesions. Thus, the present study aimed to evaluate the immunoeexpression of proteins related to autophagy (Atg7, LC3A, LC3B, p62 and p-mTOR) in PGCL and CGCL. The sample consisted of 10 cases of CGCL, 10 cases of non-aggressive CGCL and 10 cases of aggressive CGCL. In the clinical study, CGCL were classified as non-aggressive or aggressive, based on the criteria described by Chuong et al. (1986). In the immunohistochemical study, the percentages of positive MC, cannibal MGC (cMGC) and non-cannibal MGC (ncMGC) (cytoplasm and nucleus) were established in 5 fields of greater immunoreactivity (400x) to antibodies. The data obtained were statistically analyzed using the Mann-Whitney and Spearman correlation tests ($p < 0.05$). Cytoplasmic expression of Atg7, LC3A, LC3B and p62 was found in all groups of lesions and cell types analyzed, with high median percentages of positivity. In MC, aggressive CGCL showed higher Atg7 expression compared to non-aggressive CGCL ($p = 0.041$). For LC3A, non-aggressive CGCL showed lower immunoreactivity in MC when compared to PGCL ($p = 0.041$) and aggressive CGCL ($p = 0.049$). Compared to non-aggressive CGCL, PGCL exhibited higher immunoeexpression of LC3B and p62, both in MC ($p = 0.007$; $p = 0.034$, respectively) and in ncMGC ($p = 0.034$; $p = 0.034$, respectively). All groups had low median percentages of p-mTOR positivity in both MC and MGC. Compared to non-aggressive CGCL, PGCL showed higher p-mTOR expression in cMGC ($p = 0.036$). Regarding the nuclear expression of Atg7, LC3A and p-mTOR, all groups showed low median positivity percentages. In CM, aggressive CGCL showed greater positivity for Atg7 compared to PGCL ($p = 0.005$). For LC3A, PGCL showed higher nuclear expression in cMGC compared to aggressive CGCL ($p = 0.036$). In turn, in all groups of lesions and cell

types, there was a higher nuclear expression of LC3B and p62 compared to other proteins related to autophagy. In MC, PGCL exhibited greater immunoreactivity for LC3B when compared to non-aggressive CGCL ($p=0.049$). In all groups, statistically significant correlations were found between immunoexpressions of proteins related to autophagy ($p<0.05$). In conclusion, the results of this study suggest a potential involvement of autophagy in the pathogenesis of PGCL and CGCL. Differences in the biological behavior of aggressive and non-aggressive LLCG, however, appear to be unrelated to this intracellular catabolic mechanism. Furthermore, through nuclear functions not necessarily related to autophagy, the LC3B and p62 proteins may contribute to the development of PGCL and CGCL.

Keywords: Giant cells; Peripheral giant cell lesion; Central giant cell lesion; Autophagy; Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Do inglês <i>protein kinase B</i> , traduzido como proteína quinase B.
AMP	Do inglês <i>adenosine monophosphate activated protein</i> , traduzido como proteína ativada por monofosfato de adenosina.
AMPK	Do inglês <i>adenosine monophosphate activated protein kinase</i> , traduzido como proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina.
ATP	Do inglês <i>adenosine triphosphate</i> traduzido como adenosina trifosfato.
ATG	Do inglês <i>autophagy related</i> , traduzido como proteína relacionada à autofagia.
ATG12	Do inglês <i>autophagy related 12</i> , traduzido como proteína relacionada à autofagia 12.
ATG5	Do inglês <i>autophagy related 5</i> , traduzido como proteína relacionada à autofagia 5.
ATG7	Do inglês <i>autophagy related 7</i> , traduzido como proteína relacionada à autofagia7.
BNIP3	Do inglês <i>BCL2 interacting protein 3</i> , traduzido como proteína 3 de interação BCL2
BECN1	Do inglês <i>beclin 1</i> , traduzido como beclina 1.
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CD31	Do inglês <i>cluster of differentiation 31</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 31.
CD34	Do inglês <i>cluster of differentiation 34</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 34.
CD44	Do inglês <i>cluster of differentiation 44</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 44.
CD105	Do inglês <i>cluster of differentiation 105</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 105.
CGM	Células gigantes multinucleadas.
CGMc	Células gigantes multinucleadas canibais.
CGMnc	Células gigantes multinucleadas não canibais.

CM	Célula mononucleada.
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
CTSK	Do inglês <i>cathepsin k</i> , traduzido como catepsina K.
FYVE	Do inglês <i>Autophagy-linked FYVE protein</i> , traduzido como proteína FYVE ligada à autofagia.
H3F3A	Do inglês <i>H3 histone, family 3A</i> , traduzido como histona H3, família 3A.
HIF-1α	Do inglês <i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> , traduzido como fator alfa-1 induzível por hipóxia.
LC3	Do inglês <i>microtubule-associated protein light-chain 3</i> , traduzido como proteína de cadeia leve associada a microtúbulos 3.
LC3A	Do inglês <i>microtubule-associated protein light-chain 3A</i> , traduzido como proteína de cadeia leve associada a microtúbulos 3A.
LC3B	Do inglês <i>microtubule-associated protein light-chain 3B</i> , traduzido como proteína de cadeia leve associada a microtúbulos 3B.
LCCG	Lesão central de células gigantes.
LPCG	Lesão periférica de células gigantes.
MMP-2	Do inglês <i>matrix metalloproteinase-2</i> , traduzido como metaloproteinase de matriz-2.
MMP-9	Do inglês <i>matrix metalloproteinase-9</i> , traduzido como metaloproteinase de matriz-9.
NFATC1	Do inglês <i>nuclear factor of activated T cells 1</i> , traduzido como fator nuclear de células T-1 ativadas.
NF-κB	Do inglês <i>nuclear factor-κB</i> , traduzido como fator nuclear- kappa B.
OCT-4	Do inglês <i>octamer-binding transcription factor 4</i> , traduzido como Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
OPN	Do inglês <i>osteopontin</i> , traduzido como osteopontina.
P53	Do inglês <i>protein 53</i> , refere-se ao gene <i>P53</i> ou à proteína P53.
P62	Do inglês <i>protein 62</i> , refere-se ao gene <i>P62</i> ou à proteína P62.
P63	Do inglês <i>protein 63</i> , refere-se ao gene <i>P63</i> ou à proteína P63.
p-mTOR	Do inglês <i>phosphorylated mammalian target of rapamycin</i> , refere-se à forma fosforilada da proteína alvo da rapamicina em mamíferos.

RANK	Do inglês <i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i> , traduzido como ativador do receptor do fator nuclear kappa B.
RANKL	Do inglês <i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i> , traduzido como ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B.
SH3BP2	Do inglês <i>SH3 domain-binding protein 2</i> , traduzido como proteína 2 de ligação ao domínio SH3.
SOX2	Do inglês <i>SRY-box transcription factor 2</i> , traduzido como SRY-box fator de transcrição 2.
SPSS	Do inglês <i>statistical package for social sciences</i> , traduzido como programa estatístico para ciências sociais.
SQSTM1	Do inglês <i>sequestosome 1</i> , traduzido como sequestossomo-1.
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico.
TNFSF11	Do inglês <i>TNF superfamily member 11</i> , traduzido como membro 11 da superfamília TNF.
TRAP	Do inglês <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i> , traduzido como fosfatase ácida resistente ao tartarato.
TRIS	Do inglês <i>tris-hydroxymethyl-aminomethane</i> , traduzido como tris-hidroximetil-aminometano.
TSC1	Do inglês <i>tuberous sclerosis complex 1</i> , traduzido como complexo de esclerose tuberosa 1.
TSC2	Do inglês <i>tuberous sclerosis complex 2</i> , traduzido como complexo de esclerose tuberosa 2.
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba.
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
USA	Do inglês <i>United States of America</i> , traduzido como Estados Unidos da América.
WT1	Do inglês <i>Wilms' tumor protein 1</i> , refere-se à proteína do tumor de Wilms.
µm	Micrômetro.
α-SMA	Do inglês <i>alpha-smooth muscle actin</i> , traduzido como alfa-actina de músculo liso.

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1-	Distribuição dos casos de LPCG, LCCG não agressiva e LCCG agressiva de acordo com os dados clínicos.....	68
Tabela 2-	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.....	69
Tabela 3-	Tamanho da amostra, número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (núcleo e citoplasma) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em relação as CM, CGMc e CGMnc.....	70
Tabela complementar 1-	Coeficientes de correlação de Spearman (r) e respectivas significâncias estatísticas (p) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nas LPCG em CM, CGMc e CGMnc.....	72
Tabela complementar 2-	Coeficientes de correlação de Spearman (r) e respectivas significâncias estatísticas (p) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nas LCCG não agressivas em CM, CGMc e CGMnc.....	73
Tabela complementar 3-	Coeficientes de correlação de Spearman (r) e respectivas significâncias estatísticas (p) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nas LCCG agressivas em CM, CGMc e CGMnc.....	74

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
Figura 1-	Representação esquemática das principais etapas da autofagia.....	27
Figura 2-	Processo de autofagia e proteínas relacionadas.....	30
Figura 3-	O papel da autofagia em osteoclastos.....	31
Quadro 1-	Elenco de variáveis analisadas no estudo.....	37
Quadro 2-	Critérios clínicos e radiográficos para classificação das LCCG em não agressivas e agressivas.....	38
Quadro 3-	Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	40
ARTIGO		
Figura 1-	Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Atg7 nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (<i>EnVisionTM</i> , 200×). Destaque para a CGMc (A), CM (B) e CGMnc (C).....	60
Figura 2-	Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em CM nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas.....	61
Figura 3-	Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em CGMc nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas.....	62
Figura 4-	Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em CGMnc nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas.....	63
Figura 5-	Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de LC3A nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (<i>EnVisionTM</i> , 200×). Destaque para CM (A), CGMc (B) e CGMnc (C).....	64
Figura 6-	Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de LC3B nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e	

	LCCG agressiva (C) (<i>EnVisionTM</i> , 200×). Destaque para CM (A), CGMnc (B) e CGMc (C).....	65
Figura 7-	Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de p62 nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (<i>EnVisionTM</i> , 200×). Destaque para CM (A), CGMc (B) e CGMnc (C).....	66
Figura 8-	Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de p-mTOR nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (<i>EnVisionTM</i> , 200×). Destaque para CM (A), CGMc (B) e CGMnc (C).....	67

SUMÁRIO

		Página
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	22
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	Objetivo geral.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3	METODOLOGIA.....	36
3.1	Considerações éticas.....	36
3.2	Caracterização do estudo.....	36
3.3	População.....	36
3.4	Amostra.....	36
3.4.1	<i>Critérios de inclusão.....</i>	36
3.4.2	<i>Critérios de exclusão.....</i>	37
3.5	Variáveis.....	37
3.6	Estudo clínico.....	37
3.7	Estudo imunoistoquímico.....	38
3.7.1	<i>Método imunoistoquímico.....</i>	38
3.7.2	<i>Análise imunoistoquímica.....</i>	40
3.8	Análise estatística.....	41
4	ARTIGO.....	43
4.1	Apresentação.....	44
4.2	Artigo a ser submetido.....	45
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICES A- Ficha para coleta de dados referente à análise imunoistoquímica das proteínas relacionadas à autofagia em LCCG e LPCG.....	90
	ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa da UEPB.....	90
	ANEXO B- Normas para submissão de artigos ao periódico Head And Neck Pathology.....	93

Considerações iniciais

1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Células gigantes multinucleadas (CGM) são formadas a partir da fusão de macrófagos (AHMADZADEH *et al.*, 2023). No universo dos processos patológicos que apresentam esses tipos celulares em sua composição, destacam-se a lesão periférica de células gigantes (LPCG) (ZARGARAN *et al.*, 2019) e a lesão central de células gigantes (LCCG) (HOSUR *et al.*, 2018). Embora apresentem características histopatológicas similares, com a presença de CGM semelhantes a osteoclastos e células mononucleadas (CM), essas lesões revelam diferenças importantes em relação à apresentação clínica e ao comportamento biológico (YOON *et al.*, 2019).

A LPCG é uma lesão de natureza reacional, localizada em tecidos moles, que apresenta baixo potencial de recidiva (ZARGARAN *et al.*, 2019). A sua patogênese é investigada, e mediadores da inflamação como IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α foram associados à sua formação. A inter-relação dessas citocinas pró-inflamatórias estimulam a diferenciação osteoclástica de forma sinérgica, além de aumentar a produção de RANKL e OPG, dessa forma propiciando a remodelação óssea (EKICI *et al.*, 2022). Em especial, pesquisas recentes demonstram mutações do gene *KRAS*, geralmente associada a neoplasias malignas, em LPCG relacionadas a implantes dentários (MARTINS-CHAVES *et al.*, 2020; FRIEDRICH *et al.*, 2021).

Sua prevalência é variável, sendo vista em praticamente qualquer idade, especialmente entre 20 e 30 anos, com leve predisposição para o sexo feminino (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2021; MONTAZER; FARZINNIA; JAAFARI-ASHKAVANDI, 2022). A LPCG se desenvolve na gengiva ou rebordo alveolar. Em especial, a mandíbula é ligeiramente mais afetada que a maxila. Em alguns casos, por apresentar potencial de reabsorção, essa lesão pode ocasionar reabsorção superficial do osso alveolar em forma de “taça” até a perda focal da crista óssea (FLAITZ, 2000; CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018).

Clinicamente, a LPCG se apresenta exclusivamente na gengiva ou no rebordo alveolar edêntulo, como nódulo de coloração que varia do vermelho ao vermelho-azulado (BODHANKAR *et al.*, 2020; EKICI *et al.*, 2022). Apresenta-se com inserção clínica sésil ou pediculada, com tamanho médio de 2 cm de diâmetro e pode estar secundariamente ulcerada. O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras lesões não neoplásicas, em destaque para o granuloma piogênico da gengiva e o fibroma ossificante periférico devido às suas semelhanças clínicas como localização anatômica, coloração e inserção (KHANNA *et al.*, 2021).

Ao microscópio, LPCG apresenta duas populações celulares principais: CGM e CM. Em especial, as CGM apresentam núcleos com quantidade e morfologias variáveis, ora grandes e vesiculosos, ora picnóticos e hipercromáticos. Por outro lado, as CM apresentam núcleos volumosos ovoides e fusiformes, com ocasionais figuras de mitose. A presença de hemorragia abundante e por consequência, o depósito de pigmento de hemossiderina, podem ser observados. Podem ser identificadas células inflamatórias agudas e crônicas, bem como, algumas áreas de formação de osso reacional ou de calcificações distróficas (CHRCANOVIC; GOMEZ; GOMEZ, 2018; EKICI *et al.*, 2022).

A excisão cirúrgica é o principal tratamento para LPCG (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018). Em especial, deve ser realizada raspagem dos dentes adjacentes para minimizar o risco de recidiva. A curetagem após excisão cirúrgica diminui a probabilidade de recorrência em 85% em comparação com a excisão isolada (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018; MARTINS-CHAVES *et al.*, 2020).

Por outro lado, a LCCG é uma lesão intraóssea com etiologia desconhecida (GUIMARÃES *et al.*, 2022), constituindo cerca de 10% de todas as lesões benignas dos ossos maxilares (HOSUR *et al.*, 2018) cuja natureza permanece em discussão. Nesse sentido, sugere-se que a LCCG pode representar um processo reacional ou uma verdadeira neoplasia benigna (GOMES *et al.*, 2020). Estudos genéticos revelam alterações que podem estar relacionadas à etiopatogênese dessa lesão. Casos esporádicos de LCCG têm sido associados a mutações somáticas dos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* (GOMES *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2021). Além disso, essas lesões podem estar relacionadas ao hiperparatireoidismo ou síndromes subjacentes, como querubismo (ARGYRIS *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2018).

As LCCG exibem comportamento biológico e curso clínico que variam de uma lesão assintomática, descoberta em radiografias de rotina, a lesões mais agressivas (HOSUR *et al.*, 2018). Essas lesões podem ocorrer em pacientes com ampla faixa etária, desde 2 a 80 anos de idade, embora mais de 60% dos casos ocorram em adultos jovens (30 anos de idade) (TAHMASBI-ARASHLOW *et al.*, 2022). O sexo feminino é o mais acometido com predileção pela mandíbula na maioria dos casos. Em especial, as lesões mandibulares frequentemente cruzam a linha média (AKINYAMOJU *et al.*, 2020; TAHMASBI-ARASHLOW *et al.*, 2022).

Com base em características clínicas e radiográficas, a LCCG dos ossos gnáticos pode ser classificada em duas categorias: não agressiva e agressiva (CHUONG *et al.* 1986). As LCCG não agressivas, que correspondem a maioria dos casos, são relativamente pequenas, de crescimento lento, com pouca ou nenhuma sintomatologia e não apresentam áreas de perfuração

da cortical ou reabsorção radicular. Frequentemente, as LCCG não agressivas são diagnosticadas em exame radiográfico de rotina ou quando provocam expansão indolor nos ossos gnáticos (CHUONG *et al.* 1986; BATISTA SEVERO *et al.*, 2018; MELO-MUNIZ *et al.*, 2019; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021).

Por outro lado, as LCCG agressivas se caracterizam pelo crescimento rápido, com sintomatologia dolorosa, rompimento de cortical óssea, reabsorção radicular, deslocamento dentário e/ou parestesia. Alguns casos podem se estender ao tecido mole sobrejacente, com eventual ulceração da mucosa de revestimento da região. Geralmente, as LCCG agressivas são diagnosticadas em indivíduos jovens e exibem considerável tendência ao desenvolvimento de recidivas (CHUONG *et al.* 1986; BATISTA SEVERO *et al.*, 2018; MELO-MUNIZ *et al.*, 2019; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021).

Radiograficamente, as LCCG se apresentam como lesões radiolúcidas uniloculares ou multiloculares, bem delimitadas e com ampla variação de tamanho. Os diagnósticos diferenciais variam de acordo com o tamanho dessas lesões. Lesões uniloculares de pequeno diâmetro podem ser confundidas com granulomas periapicais ou cistos, e lesões multiloculadas podem ter aspecto similar aos ameloblastomas (SHRESTHA *et al.*, 2021). Em especial, a tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) pode ser um recurso importante para o planejamento e diagnóstico dos casos de LCCG. A TCFC supera as limitações de radiografias bidimensionais, como a periapical e a panorâmica dos maxilares, pois visualiza estruturas tridimensionalmente e revela características radiográficas detalhadas das lesões e permite melhor planejamento cirúrgico (TAHMASBI-ARASHLOW *et al.*, 2022).

Ao microscópio, a LCCG dos ossos gnáticos exibem CGM em quantidade variadas na presença de CM com formato ovoide a fusiforme. Especialmente, a presença de um componente de células fusiformes pode estar relacionada a proliferação da população de células que recrutam macrófagos-monócitos precursores, induzindo a diferenciação em osteoclastos gigantes. Essas células podem estar presentes em toda a lesão de forma agregada ou difusa. A presença de CGM semelhantes a osteoclastos e de um estroma vascular, bem como focos de hemorragia e pigmento hemossiderina, podem ser vistos com frequência nessas lesões (MARTINI *et al.*, 2018; AKINYAMOJU *et al.*, 2020; TAHMASBI-ARASHLOW *et al.*, 2022).

A natureza e função das CGM nas LPCG e LCCG são discutidos na literatura. Estudos demonstraram que essas células são capazes de reabsorver osso e são fenotipicamente indistinguíveis dos osteoclastos. As CM do estroma exibem marcadores osteoblásticos e,

possivelmente, interagem com monócitos recrutados para o microambiente, estimulando a formação de CGM/osteoclastos (YOON *et al.*, 2019; AHMADZADEH *et al.*, 2023).

Ainda no contexto de componente celular, frequentemente podem ser observadas CGM canibais (CGMc) em lesões de células gigantes. Por definição, o canibalismo celular é o termo usado para descrever o fenômeno “*cell-eat-cell*”, no qual uma célula maior engolfa outra de menor proporção dentro de seu citoplasma. Esse fenômeno tem sido frequentemente descrito como uma característica de neoplasias malignas agressivas, mas foi recentemente demonstrado em lesões de células gigantes, incluindo LPCG e LCCG (YAMING; MALHOTRA, 2018). A presença de células canibais em lesões malignas é correlacionada com a agressividade, grau de anaplasia, capacidade de invasão e potencial metastático. No entanto, o papel do canibalismo celular não é totalmente compreendido. Estudos indicam que sua presença pode servir como fonte de nutrição para a célula em proliferação que apresenta esse comportamento canibal (SARODE; SARODE, 2014; SARODE *et al.*, 2017; URS; YAMING; MALHOTRA, 2018).

As CGMc podem ser identificadas com dois padrões diferentes: o canibalismo parcial ou completo da CM. No canibalismo parcial é observado um pseudópode formado pela CGM canibal em torno da CM. Entre a CM e a membrana celular da CGM é vista uma pequena concavidade na membrana da CGM. Por outro lado, nos casos de canibalismo completo, a CM está completamente fechada dentro do citoplasma da CGMc. Nesses casos, é observado um halo claro circundando a CM internalizada. Além disso, a CM pode exibir aparência apoptótica com a perda nuclear e com o aumento da densidade citoplasmática (SARODE *et al.*, 2017).

Em especial, quando as células canibais estão presentes nas LCCG e LPCG podem estar relacionadas a alta atividade metabólica e podem ser correlacionadas com o comportamento biológico agressivo das lesões. Estudos apontam a importância da presença desse componente celular como auxiliar no planejamento do caso (SARODE *et al.*, 2017; URS; YAMING; MALHOTRA, 2018).

O tratamento recomendado para a LCCG dos ossos gnáticos é a cirurgia com curetagem. Nas lesões recorrentes, pode ser necessária curetagem adicional, combinada com a osteotomia periférica, ou ressecção em bloco. Terapêuticas alternativas incluem injeções intralesionais de corticosteroides (BATISTA SEVERO *et al.*, 2018; NILESH; DADHICH; PATIL, 2020; MENDONÇA *et al.*, 2021; NIEDZIELSKA *et al.*, 2023), calcitonina subcutânea ou nasal, interferon alfa-2a subcutâneo, imatinib e bifosfonatos (MENDONÇA *et al.*, 2021; POGREL; HOSSAINI-ZADEH, 2021). Apesar disso, mais estudos que verifiquem alternativas farmacológicas que viabilizem uma abordagem cirúrgica menos invasiva, devem ser realizadas

(TOFERER *et al.*, 2021). Devido ao potencial agressivo de alguns casos de LCCG, as taxas de recidivas possuem alto grau de variância (11% a 49%) (TOFERER *et al.*, 2021). Apesar do potencial de recorrência, o prognóstico a longo prazo é favorável, com baixa morbidade (TOFERER *et al.*, 2021).

Diante das similaridades morfológicas entre LPCG e LCCG, diversos estudos foram realizados para esclarecer as diferenças na patogênese e no comportamento biológico dessas lesões. Pesquisas mais recentes têm ressaltado que tais diferenças podem estar relacionadas a proteínas envolvidas no reparo ósseo, em especial a osteopontina (OPN) (AKSAKALLI, 2018), no reparo tecidual, como a metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) (MOHTASHAM *et al.*, 2019), na proliferação e adesão celulares, como p63 (NAGAR *et al.*, 2020) e CD44 (ZARGARAN *et al.*, 2019), bem como a marcadores de células pluripotentes, com a OCT-4 e SOX-2 (BODHANKAR *et al.*, 2020).

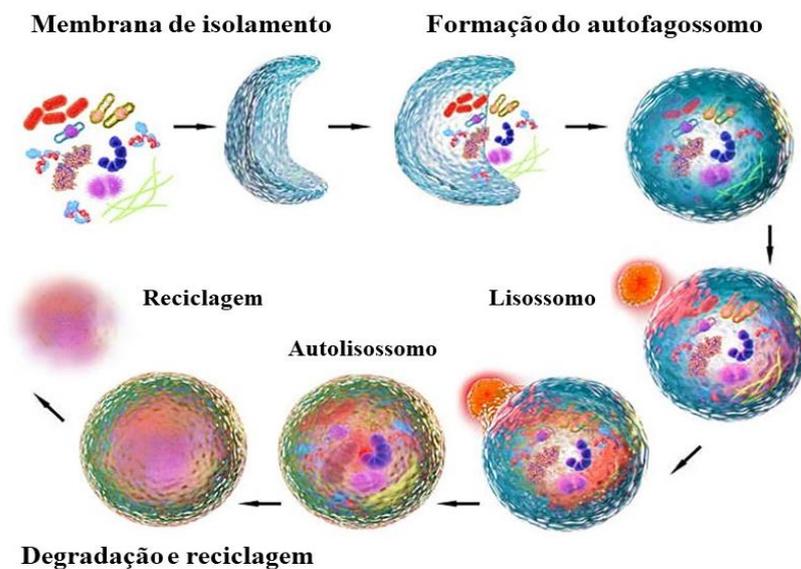
Além disso, as diferenças no comportamento biológico dos subtipos das LCCG constituem importante objeto de investigação científica. Pesquisas avaliaram fatores relacionados ao crescimento e diferenciação celulares, com a ciclina D1 (ATARBASHI MOGHADAM, GHORBANPOU, 2018) e α -actina de músculo liso (α -SMA) (MELO-MUNIZ *et al.*, 2019), reguladores de atividades osteoclásticas e biológicas, como o receptor de calcitonina (MELO-MUNIZ *et al.*, 2020) e o receptor de glicocorticoide (BATISTA SEVERO *et al.*, 2018). Outros estudos analisaram a expressão de proteínas relacionadas à angiogênese, como CD31 (RAZAVI; YAHYAABADI, 2018), WT1 e CD105 (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021), mutações na histona H3.3 (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021) e proteínas envolvidas em processos de reparo, como a tenascina-C (TOBÓN-ARROYAVE *et al.*, 2021). Embora os resultados dessas pesquisas contribuam para a compreensão da patogênese das LCCG, os mecanismos responsáveis pelas diferenças no comportamento biológico de LCCG agressivas e LCCG não agressivas permanecem incompletamente compreendidos.

No contexto de moduladores da osteoclastogênese, destaca-se a autofagia. Pesquisas verificaram o papel importante da autofagia em processos fisiológicos, incluindo a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea (MONTASERI *et al.*, 2020; AOKI; SHIMIZU; ITO, 2020), e patológicos, como a osteoporose (GUO *et al.*, 2021; TROJANI *et al.*, 2022) e a tumorigênese (YANG *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2020; RANGEL *et al.*, 2022). No entanto, até o momento (PubMed – acesso em 15/04/2023), pouco se sabe sobre uma eventual participação destas proteínas na patogênese de LCCG e LPCG.

A autofagia corresponde a um mecanismo intracelular catabólico, no qual as células degradam seus próprios componentes citoplasmáticos dentro de seus lisossomos. Neste processo, as células regulam seu volume e utilizam os produtos derivados desta degradação para sua sobrevivência (JING *et al.*, 2015; RANGEL *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022).

Durante o processo autofágico, uma estrutura de membrana única, denominada membrana de isolamento, envolve porções do citoplasma e organelas. Posteriormente, ocorre a fusão das pontas de isolamento da membrana, formando o autofagossomo, estrutura com cerca de 1 μm de diâmetro, de formato esférico e de dupla membrana. Em sequência, o autofagossomo se funde com os lisossomos e, o conteúdo sequestrado juntamente com as membranas internas são degradados pelas hidrolases lisossômicas (YOSHIMORI, 2004; BOYA *et al.*, 2009; LEVINE; KROEMER, 2009) (FIGURA 1).

Figura 1- Representação esquemática das principais etapas da autofagia.



Fonte: Adaptado de Boya *et al.* (2009).

Foram descritos ao menos três tipos de autofagia em células eucarióticas: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperona, que diferem quanto ao modo de entrega do material a ser catabolizado pelo lisossomo (YANG; KLIONSKY, 2010). O termo “autofagia” geralmente indica 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 (YANG; KLIONSKY, 2010; JING *et al.*, 2015; RANGEL *et al.*, 2022). Por outro

lado, na microautofagia, os componentes citosólicos são encaminhados diretamente para o lisossomo por meio de invaginação da membrana citoplasmática. A autofagia mediada por chaperona, descrita apenas em mamíferos, é caracterizada pela entrega das proteínas de substrato para o lisossomo, por meio da proteína Hsp70, membro da família das proteínas de choque térmico de 70 quilodáltons (CUERVO; WONG, 2014).

Os aminoácidos, produtos da degradação de componentes citosólicos, podem ser reutilizados pela célula e atuam como reguladores negativos para o processo de autofagia. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma molécula-chave em vias de sinalização de detecção de nutrientes, que participa na regulação da autofagia. A inibição da mTOR por rapamicina induz a autofagia mesmo em células cultivadas na presença de aminoácidos (DENNIS *et al.*, 2001; RANGEL *et al.*, 2022). Além dos nutrientes, alguns hormônios também desempenham um papel no controle da autofagia. A insulina, por exemplo, inibe a autofagia, ao passo que os glucagons estimulam este processo (YOSHIMORI, 2004).

Embora os sinais hormonais possam ser integrados à via mTOR, existe também uma via dependente de proteína Akt, que regula a autofagia e é dependente de insulina, mas independente da rapamicina. Tais achados sugerem a existência de múltiplas vias de sinalização na regulação da autofagia (YOSHIMORI, 2004).

A autofagia é um processo evolutivamente conservado, coordenado finamente por genes da família *ATG*. As proteínas codificadas a partir desses genes são necessárias para o correto funcionamento das atividades específicas durante as diversas etapas do processo autofágico (LEONE; AMARAVADI, 2013; JI *et al.*, 2019; RANGEL *et al.*, 2022).

O processo de 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* sofre lipidação por *Atg7* e, em consequência, acopla-se à membrana do autofagossomo em formação (YANG; KLIONSKY, 2010; RANGEL *et al.*, 2022). É importante salientar que outras proteínas estão envolvidas na sinalização da autofagia, modulando o processo autofágico positiva ou negativamente (LEONE *et al.*, 2013; JI *et al.*, 2019).

A proteína mTOR é uma serina-treonina quinase presente em dois complexos proteicos citoplasmáticos: complexo mTOR insensível à rapamicina e complexo mTOR sensível à rapamicina. A principal função da mTOR é atuar como sensor dos níveis de ATP e

aminoácidos, a fim de coordenar o balanço e a disponibilidade de nutrientes e o crescimento celular (DUNLOP *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2022). Quando a autofagia e a síntese proteica são ativadas, Akt fosforila a proteína mTOR no sítio Ser2448 e, a partir desta primeira fosforilação, mTOR realiza autofosforilação da Ser2481. Uma vez ativada, p-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; PARK *et al.*, 2022).

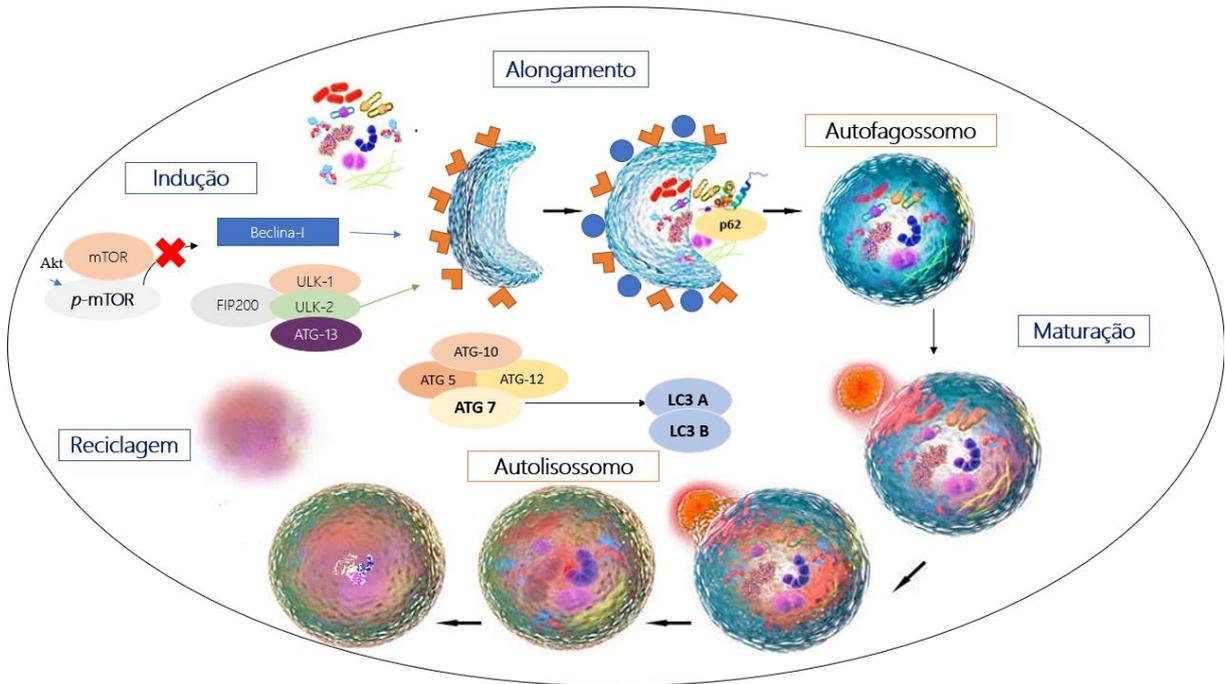
Além da p-mTOR, destaca-se a participação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). A AMPK tem sua ativação em situações de estresse de energia, como em baixos níveis de ATP intracelular durante a hipóxia e com a privação de nutrientes. Esta proteína responde ao estresse energético suprimindo o crescimento celular e processos biossintéticos por meio da inibição da via p-mTOR sensível à rapamicina. A AMPK atua no processo autofágico na fosforilação dos produtos proteicos do gene supressor tumoral *TSC2* e, desse modo, está envolvida na supressão de p-mTOR (JUNG *et al.*, 2022).

A proteína LC3 está presente no meio celular em duas formas: LC3I (citosólica) e LC3II (ligada ao autofagossomo durante a autofagia) (CHU *et al.*, 2014). Durante a autofagia, os cinco aminoácidos C-terminais de LC3 (LC3I não conjugada) são clivados pela proteína Atg4, fase necessária para ligar a proteína à fosfatidiletanolamina, após a ativação por Atg7 e ligação por Atg3, na membrana autofagossômica (LC3II conjugada). 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). Por fim, a ligação de LC3I com a fosfatidiletanolamina é clivada por uma segunda reação dependente de Atg4, enquanto LC3II é degradada no lúmen do autofagolisossomo. Dessa forma, a conversão de LC3 (LC3I para LC3II) e a degradação lisossômica de LC3II refletem a progressão da autofagia e têm sido utilizadas para monitorar a atividade autofágica (CHU *et al.*, 2014; JIANG; MIZUSHIMA, 2015; ZHANG *et al.*, 2020). Especialmente em humanos, LC3 demonstra as isoformas LC3A, LC3B e LC3C (SUZUKI *et al.*, 2014).

A proteína p62, também designada sequestrassomo 1 (SQSTM1), 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 (RACOMA *et al.*, 2013;

JIANG; MIZUSHIMA, 2015). Dessa forma, a proteína SQSTM1 tem sido sugerida como um marcador para avaliar o fluxo autofágico (JIANG; MIZUSHIMA, 2015) (FIGURA 2).

Figura 2- Processo de autofagia e proteínas relacionadas. Interação das principais proteínas (p-mTOR, Atg7, p62 e LC3) relacionadas à autofagia no processo de ativação do autofagossoma e autolisossomo.



Fonte: Adaptado de Leone e Amaravadi (2013).

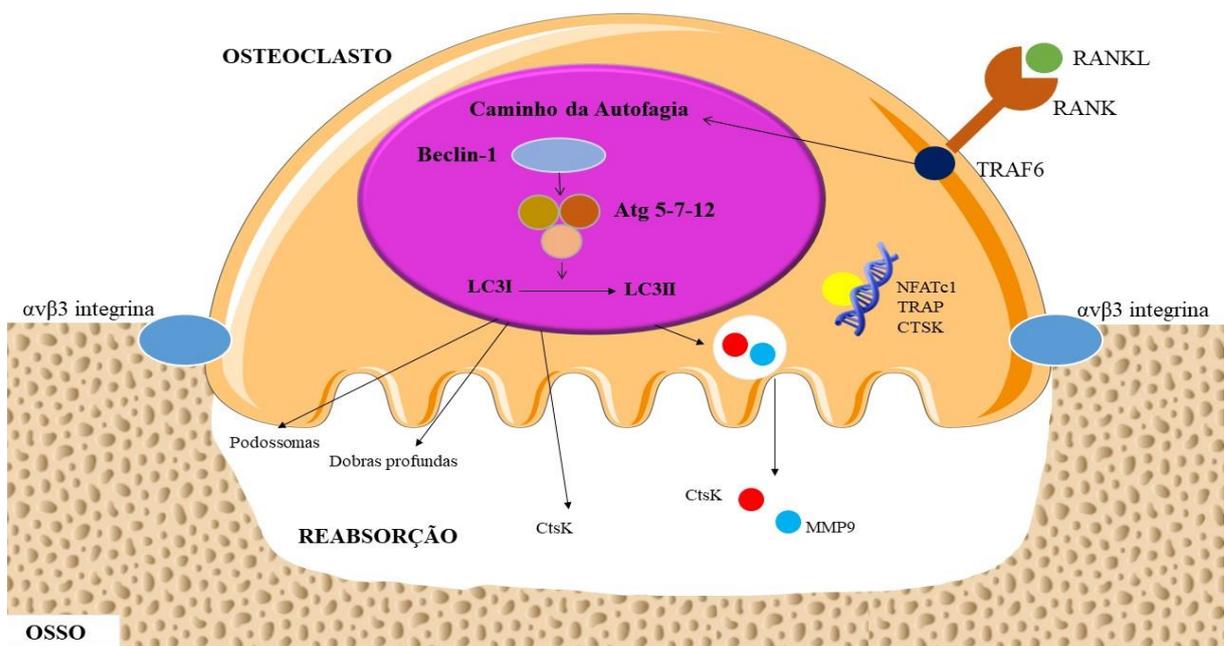
A autofagia pode ser um importante estimulador da atividade osteoclástica. Para que ocorra a reabsorção óssea, é necessária a ligação dos osteoclastos à superfície da matriz óssea, por meio de podossomas. Em sequência, são formadas dobras profundas e irregulares que liberam enzimas lisossômicas em direção à matriz óssea. Evidências indicam que esse procedimento pode ser estimulado pela ação das proteínas relacionadas à autofagia (MORTASERI *et al.*, 2020).

A participação da autofagia na reabsorção e na formação óssea é discutida na literatura (MONTASERI *et al.*, 2020; AOKI; SHIMIZU; ITO, 2020; GUO *et al.*, 2021; TROJANI *et al.*, 2022). Propõe-se que a formação de minerais pelos osteoblastos seja iniciada no interior das vesículas, seja após sua secreção, como nas vesículas da matriz, seja antes de sua secreção. Dentro da célula, a mineralização pode ocorrer em vesículas semelhantes às observadas na autofagia. Essas vesículas assumem-se como cargas para o transporte de cristais minerais em

forma de agulha, contendo cálcio e fosfato, que podem facilitar a mineralização da matriz óssea. Vale salientar que a inibição da autofagia pode resultar no comprometimento da mineralização óssea e diminuição da massa óssea (MONTASERI *et al.*, 2020) (FIGURA 3).

Na osteoclastogênese, em especial, estudos têm sugerido o envolvimento da autofagia em virtude da sua indução a partir da baixa tensão de oxigênio que os osteoclastos podem ser submetidos no interior do osso. Uma vez sob estresse, pode ocorrer o recrutamento de HIF1A/HIF-1 α que estimula a expressão de BECN1, Atg5 e LC3 e aumenta a expressão de NFATC1, um marcador chave para osteoclastogênese e MMPs para promover a proliferação e diferenciação de osteoclastos (MONTASERI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Desse modo, os osteoclastos podem migrar na matriz óssea e iniciar sua ação de reabsorção. Esse processo de migração é modulado pela montagem e desmontagem dos anéis de podossoma. Para que isso ocorra, deve ser iniciada uma interação de Kindlin 3 (proteína de coesão crucial em podossomas) com LC3B, que por sua vez promove a sua degradação e resulta na desmontagem do podossoma (ZHANG *et al.*, 2020). Diante desse contexto, estudos buscam através da autofagia um alvo terapêutico para lesões ósseas (JI *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2022).

Figura 3- O papel da autofagia em osteoclastos. RANKL secretado por osteoblastos e osteócitos se liga ao seu receptor RANK em osteoclastos e leva ao recrutamento de TRAF6 e aumento de Beclin-1 e Atg5/7/12 com a conversão de LC3I para LC3II. Esta via autofágica aumenta a expressão dos genes dos osteoclastos *NFATc1*, *TRAP* e *CTSK*, ativação da atividade de reabsorção óssea estimulando a secreção de CtsK e MMP-9.



Fonte: Adaptado de Montaseri *et al.* (2020).

Além disso, evidências demonstram um papel importante da autofagia como mediador da tumorigênese. Nesse contexto, pesquisas demonstraram que a LC3 e p62 promovem a sobrevivência celular por meio de mecanismos, como mitigação do estresse metabólico e reciclagem de componentes intracelulares, que fornecem substratos para vias metabólicas e biossintéticas. Estudos indicam, ainda, a participação da autofagia na manutenção do metabolismo mitocondrial, que é crítico para a sobrevivência celular e tumorigênese, por meio da mitofagia e reciclagem de substratos (AOKI; SHIMIZU; ITO, 2020; RANGEL *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o estudo de You *et al.* (2022) verificou através da técnica de imunofluorescência, western blot e imunistoquímica, que proteínas autofágicas, como Atg7 e LC3B, podem atuar na formação de células cancerígenas gigantes poliploides. Essas células, por sua vez, promovem metástase e aumentam a sobrevivência de tumores. Desse modo, discute a inibição da autofagia como alvo terapêutico, uma vez que a não atuação dessas proteínas relacionadas a autofagia, pode prevenir a formação das células gigantes poliploides.

Embora as evidências sugiram uma importante participação das proteínas relacionadas à autofagia na osteoclastogênese e na tumorigênese, até o momento, pouco se sabe sobre a expressão dessas proteínas em LPCG e LCCG.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a imunexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR) em LPCG e LCCG.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil clínico da amostra (sexo, idade e localização da lesão);
- Classificar os casos de LCCG com base em suas características clínicas e radiográficas (agressivas ou não agressivas);
- Determinar os percentuais de CGMnc, CGMc e CM imunopositivas para as proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nos casos de LPCG e LCCG;
- Avaliar possíveis diferenças na imunexpressão das proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em relação à agressividade das LCCG;
- Relacionar as imunexpressões das proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR com o canibalismo celular nas lesões de células gigantes;
- Estabelecer correlações entre as imunexpressões das proteínas relacionadas à autofagia nos casos de LPCG e LCCG.

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 5.825.726 (ANEXO A).

3.2 Caracterização do estudo

O estudo consistiu em uma pesquisa observacional, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunorexpressões das proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em LPCG e LCCG.

3.3 População

A população do estudo foi constituída por casos de LPCG e LCCG, arquivados nos Laboratórios de Histopatologia Oral dos Departamentos de Odontologia da UEPB e da Universidade Federal Rio Grande do Norte (UFRN).

3.4 Amostra

O estudo foi realizado com uma amostra não probabilística de conveniência, constituída por 30 espécimes fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, obtidos a partir dos registros dos Laboratórios de Histopatologia Oral dos Departamentos de Odontologia da UEPB e da UFRN. Destes, 10 casos corresponderam a LPCG, 10 casos a LCCG não agressiva e 10 casos a LCCG agressiva.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de LPCG e LCCG que apresentaram material biológico suficiente para realização do estudo imunoistoquímico, cujos blocos de parafina estavam em bom estado de conservação. Em relação às LPCG, foram incluídos os casos localizados em gengiva/rebordo alveolar. Para as LCCG, foram selecionados apenas os casos com informações clínicas e radiográficas que permitissem a classificação em lesão

agressiva ou não agressiva, de acordo com os critérios descritos por Chuong *et al.* (1986) (QUADRO 2).

3.4.2 Critérios de exclusão

Para todos os grupos (LPCG e LCCG), foram excluídos da pesquisa os casos previamente submetidos a tratamento conservador. Lesões recorrentes também foram excluídas do estudo. Casos provenientes de pacientes com hiperparatireoidismo, querubismo e associados a síndromes foram excluídos com base na história familiar e informações clínicas, radiográficas e laboratoriais.

3.5 Variáveis

As variáveis independentes e dependentes que foram analisadas no presente estudo estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1- Elenco de variáveis analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
Atg7	Imunomarcacão para Atg7 em CM, CGMc e CGMnc.	- Percentual de células com positividade citoplasmática e nuclear	Dependente
LC3A	Imunomarcacão para LC3A em CM, CGMc e CGMnc.	- Percentual de células com positividade citoplasmática e nuclear	Dependente
LC3B	Imunomarcacão para LC3B em CM, CGMc e CGMnc.	- Percentual de células com positividade citoplasmática e nuclear	Dependente
p62	Imunomarcacão para p62 em CM, CGMc e CGMnc.	- Percentual de células com positividade citoplasmática e nuclear	Dependente
p-Mtor	Imunomarcacão para p-mTOR em CM, CGMc e CGMnc.	- Percentual de células com positividade citoplasmática e nuclear	Dependente
Tipo de lesão	Classificacão da lesão de células gigantes de acordo com sua localizacão (extraóssea ou intraóssea)	- LPCG - LCCG	Independente
Comportamento clínico	Classificacão da LCCG de acordo com suas características clínicas e radiográficas	- Agressiva - Não agressiva	Independente
Características clínicas	Critérios para caracterizacão da amostra para o estudo descritivo.	- Sexo - Idade - Localizacão anatômica	Independente

3.6 Estudo clínico

Para todos os casos de LPCG e LCCG, informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como sobre a localização anatômica das lesões foram obtidas a partir fichas de requisição de biópsia. Esses dados foram posteriormente utilizados para caracterização da amostra. Especificamente para os casos de LCCG, foram coletados dados clínicos e radiográficos referentes a sintomatologia, crescimento da lesão, deslocamento e reabsorção radicular, perfuração das corticais ósseas e recidiva. Esses dados foram utilizados para classificá-los como lesões agressivas ou não agressivas, seguindo os critérios de Chuong *et al.* (1986) (QUADRO 2):

Quadro 2- Critérios clínicos e radiográficos para classificação das LCCG em não agressivas e agressivas.

Critérios	Grupo I (Não agressiva)	Grupo II (Agressiva)
Dor	Não	Sim
Taxa de crescimento	Lenta	Rápida
Tumefação	Variável	Grande
Reabsorção radicular	Não	Frequentemente presente
Perfuração cortical	Não	Frequentemente presente
Recorrência	Não	Sim

Fonte: (CHUONG *et al.* 1986).

A recorrência foi considerada presente quando o paciente exibiu o surgimento de uma nova lesão, na mesma região anatômica, dentro de um intervalo de 24 meses após o tratamento da lesão primária (CHUONG *et al.* 1986).

3.7 Estudo imunoistoquímico

3.7.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*EnVision™ Flex+*, *Dako North America Inc.*, Carpinteria,

CA, USA), utilizando anticorpos monoclonais anti-Atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR e anticorpos policlonais anti-LC3A e anti-LC3B (QUADRO 3).

Como controle positivo, para todos os anticorpos, foram utilizados espécimes de carcinoma de células escamosas oral. O controle negativo foi realizado por meio da omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito a seguir:

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (20 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 anticorpos primários, em solução diluente (*EnVision™ Flex antibody diluent*, Dako North America Inc., Carpinteria, 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 polimerizado à peroxidase (*EnVision™ Flex/HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, 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 (*EnVision™ Flex DAB+*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (10 minutos);

- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Harris, à temperatura ambiente (1 minuto);
- ⇒ 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 tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Atg7	ab52472	Abcam	1:750	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
LC3A	#4599	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
LC3B	#3868	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
p62	ab56416	Abcam	1:600	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:200	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight

3.7.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, as lâminas foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (*MoticEasyScan Pro 6*, *Motic Inc.*, Richmond, BC, CAN) e, posteriormente, visualizadas no programa *DSAssistant* (*Motic Inc.*, Richmond, BC, CAN). Uma examinadora previamente treinada realizou as análises imunoistoquímicas, sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. As imunorexpressões das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR) foram avaliadas nas CGMnc, CGMc e CM. Para as todas as proteínas descritas anteriormente, as expressões foram analisadas, separadamente, no componente citoplasmático e nuclear.

Com base em uma adaptação da metodologia utilizada no estudo de Ouyang *et al.* (2017), foi realizada uma análise quantitativa da imunoposição de Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR. Sob aumento de 100× (*DSAssistant, Motic Inc.*, Richmond, BC, CAN), foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos. Posteriormente, sob aumento de 400× (*DSAssistant, Motic Inc.*, Richmond, BC, CAN), foram fotomicrografados cinco campos na região central das lesões. Em seguida, com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), foi realizada a contagem das CM, CGMc e CGMnc imunomarcadas e negativas em cada um dos campos microscópicos. Os valores obtidos em cada um desses campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de CM, CGMc e CGMnc positivas em relação ao total de células contadas. Os dados obtidos na análise imunohistoquímica foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A).

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; *IBM Corp.*, Armonk, NY, USA). Os dados provenientes da análise das imunoposições de Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR foram avaliados por meio do teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas, em relação aos grupos lesões, foram comparadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Correlações entre as imunoposições das proteínas relacionadas à autofagia foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. 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: “Análise imunoistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia em lesões centrais e periféricas de células gigantes.”

O artigo será submetido ao periódico *Head and Neck Pathology* (ISSN: 1936-0568; CiteScore: 3.6; Qualis Odontologia A1), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Análise imunoistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, LC3B, p-mTOR e p62) em lesões centrais e periféricas de células gigantes

Título breve: **Autofagia em lesões de células gigantes**

Allany de Oliveira Andrade¹, Elton Fernandes Barros¹, Éricka Janine Dantas da Silveira², Manuel Antonio Gordón-Núñez¹, Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹

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

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

Allany de Oliveira Andrade (<https://orcid.org/0000-0001-6162-9441>), Elton Fernandes Barros (<https://orcid.org/0000-0002-1798-4339>), Éricka Janine Dantas da Silveira (<https://orcid.org/0000-0003-2128-0147>), Manuel Antonio Gordón-Núñez (<https://orcid.org/0000-0002-7039-4004>), Pollianna Muniz Alves (<https://orcid.org/0000-0003-1297-4032>), Cassiano Francisco Weege Nonaka (<https://orcid.org/0000-0003-2380-109X>).

Número total de:

- Páginas: 31.

- Tabelas: 06.

- Figuras: 08.

Autor correspondente:

Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

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

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

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

Conformidade com os padrões éticos

Disponibilidade de dados

Não se aplica.

Disponibilidade de códigos

Não se aplica.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Aprovação ética

Todos os procedimentos realizados em estudos envolvendo participantes humanos estavam de acordo com as normas éticas do comitê de pesquisa institucional e/ou nacional e com o Declaração de Helsinque de 1964 e suas emendas posteriores ou padrões éticos comparáveis. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil (Aprovação nº 5.825.726).

Consentimento informado

Este estudo obteve a aprovação do CEP da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil (Aprovação nº 5.825.726) e a necessidade de consentimento informado foi dispensada.

ABSTRACT

Background: Autophagy is an intracellular catabolic mechanism involved in several human diseases, but its participation in the pathogenesis of lesions containing multinucleated giant cells (MGC) in its histological component is not fully elucidated. This study investigated the immunoexpression of autophagy-related proteins (autophagy 7[Atg7], microtubule-associated protein 1 light chain 3A [LC3A], microtubule-associated protein 1 light chain 3B [LC3B], p62 protein [p62] and phosphorylated mammalian target of rapamycin [p-mTOR]) in peripheral giant cell lesion (PGCL) and central giant cell lesion (CGCL).

Methods: Ten PGCL, 10 non-aggressive CGCL and 10 aggressive CGCL were selected. The percentages of cytoplasmic and nuclear positivity for autophagy-related proteins were analyzed in mononuclear cells (MC), cannibalistic multinucleated giant cells (cMGC) and non-cannibalistic multinucleated giant cells (ncMGC).

Results: Cytoplasmic immunoexpression of Atg7, LC3A, LC3B and p62 was observed in all groups, with high median percentages of positivity. Low cytoplasmic immunoexpression of p-mTOR was observed in MC, cMGC and ncMGC in the groups of evaluated lesions. Regarding the nuclear expression of Atg7, LC3A and p-mTOR, all groups showed low percentages of positivity. Particularly, LC3B and p62 showed a high nuclear immunohistochemical pattern in the evaluated groups. In all groups, statistically significant correlations were found between the immunoexpression of autophagy-related proteins ($p < 0.05$).

Conclusions: The results suggest a potential involvement of autophagy in the pathogenesis of PGCL and CGCL. Nevertheless, differences in the biological behavior of aggressive and non-aggressive CGCL may not be related to this intracellular catabolic mechanism. Additionally, LC3B and p62 proteins may contribute to the development of PGCL and CGCL through nuclear functions not necessarily related to autophagy.

Keywords: Peripheral giant cell lesion; Central giant cell lesion; Autophagy-related proteins; Immunohistochemistry.

Introdução

No universo das lesões constituídas por células gigantes multinucleadas (CGM) que acometem a cavidade oral e os ossos gnáticos, destacam-se a lesão periférica de células gigantes (LPCG) [1] e a lesão central de células gigantes (LCCG) [2]. Embora apresentem características histopatológicas similares, como a presença de CGM semelhantes a osteoclastos em meio a uma proliferação de células mononucleadas (CM) fusiformes a ovoides, essas lesões revelam diferenças importantes em relação à etiopatogênese e ao comportamento biológico [3, 4].

A LPCG é uma lesão de tecidos moles relativamente frequente em cavidade oral, causada por irritação local ou trauma, que apresenta baixas taxas de recorrência após excisão cirúrgica local [1, 3, 5]. Por sua vez, a LCCG é uma lesão intraóssea, de natureza incerta, que apresenta comportamento clínico variável [6, 7]. As LCCG não agressivas são assintomáticas, relativamente pequenas e exibem crescimento lento, ao passo que as LCCG agressivas apresentam crescimento rápido, associado à sintomatologia dolorosa, com rompimento de corticais ósseas e tendência a recidivas [8].

No intuito de esclarecer as diferenças na patogênese e no comportamento biológico de lesões compostas por CGM, em especial as LCCG, foram investigados o envolvimento de diferentes moléculas e processos, como os relacionados à remodelação óssea [3], ao reparo tecidual [4], à proliferação celular [9], à adesão celular [1] e a células pluripotentes [10]. Apesar dos avanços no conhecimento da patogênese dessas lesões, os mecanismos responsáveis pelas diferenças nos seus comportamentos biológicos, com destaque para LCCG agressivas e não agressivas, ainda estão em discussão.

No contexto de processos fisiológicos e patológicos que envolvem a participação de osteoclastos e osteoblastos, incluindo doenças ósseas metabólicas e degenerativas, pesquisas têm destacado a importância da autofagia [4, 12–15]. A autofagia é um mecanismo intracelular catabólico altamente conservado, coordenado por genes da família *ATG*. Nesse processo, as células degradam seus próprios componentes citoplasmáticos no interior de vacúolos autofágicos e utilizam os produtos derivados dessa degradação para sua sobrevivência [16].

Para que a autofagia ocorra, são necessárias diversas etapas [17]. Inicia-se com a formação de uma membrana lipídica dupla, denominada fagóforo, cujo alongamento e fechamento envolve uma série de proteínas relacionadas à autofagia (Atgs), dentre as quais se destaca a Atg7. Além de se ligar covalentemente ao complexo Atg5-Atg12, a Atg7 participa da ativação da cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3). Com três isoformas identificadas em humanos (LC3A, LC3B e LC3C), a LC3 participa do direcionamento seletivo

de substratos para degradação, por meio de sua interação com a proteína p62 [18]. A p62, por sua vez, atua como um receptor de carga para a degradação autofágica de proteínas ubiquitinadas e não ubiquitinadas [19, 20]. Além disso, p62 participa do complexo da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) [21], molécula-chave na regulação da autofagia que participa de vias de sinalização de detecção de nutrientes e crescimento celular [22]. A proteína mTOR fosforilada (p-mTOR) inibe o processo autofágico [23].

Apesar dos relevantes papéis da autofagia em diversas doenças, incluindo aquelas que envolvem a modulação das atividades de osteoclastos e osteoblastos, pouco se sabe sobre a participação deste mecanismo catabólico na patogênese de lesões de células gigantes multinucleadas. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a imunoe expressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR) em LPCG e LCCG. Pretendeu-se, com esta pesquisa, contribuir para uma melhor compreensão da patogênese e do comportamento biológicos dessas lesões, especialmente das LCCG agressivas e não agressivas.

Materiais e métodos

Amostra

A amostra foi constituída por 10 casos de LPCG, 10 casos de LCCG não agressiva e 10 casos de LCCG agressiva, diagnosticados e arquivados nos Laboratórios de Histopatologia Oral dos Departamentos de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Foram incluídos na amostra, apenas casos de LPCG e LCCG com material biológico suficiente para realização dos estudos imunoistoquímicos. Foram desconsiderados os casos de LPCG e LCCG previamente submetidos a tratamento conservador. Casos provenientes de pacientes com hiperparatireoidismo, querubismo e associados a síndromes foram excluídos com base na história familiar e exames clínicos, radiográficos e laboratoriais. Lesões recorrentes também foram excluídas do estudo. Para as LCCG, foram incluídos apenas os casos com informações clínicas e radiográficas que permitissem a classificação em lesão agressiva ou não agressiva, com base nos critérios descritos por Chuong et al. [8]. Para todos os casos incluídos no estudo, informações relativas ao sexo, idade dos pacientes e localização anatômica das lesões foram obtidas a partir de fichas de requisição de biópsia. A caracterização clínica da amostra é apresentada na Tabela 1. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB (Parecer nº 5.825.726).

Imunoistoquímica

As amostras selecionadas, fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina, foram submetidas a cortes seriados com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Tabela 2). Em sequência, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após incubação com anticorpos primários (Tabela 2), os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros de dextrano (*EnVision™ Flex+*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada por meio da imersão dos cortes em diaminobenzidina (*EnVision™ Flex DAB+*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula. Para todos os anticorpos, cortes histológicos de carcinoma de células escamosas oral foram utilizados como controle positivo. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo imunoistoquímico.

Análise imunoistoquímica

A imunoexpressão das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR) nas LPCG e LCCG foi avaliada, de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Ouyang et al. [24]. A análise da expressão das proteínas foi realizada, separadamente, em citoplasma e núcleo das CM, CGMc e CGMnc. Considerou-se como positividade a coloração acastanhada independentemente de sua intensidade.

Os cortes teciduais foram escaneados em imagens digitais de alta resolução (*MoticEasyScan Pro 6*, Motic Inc., Richmond, BC, CAN) e, posteriormente, visualizados no programa *DSAssistant* (Motic Inc., Richmond, BC, CAN). Uma examinadora previamente treinada, sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos, realizou as análises imunoistoquímicas. Sob aumento de 100x (*DSAssistant*, Motic Inc., Richmond, BC, CAN), foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos. Posteriormente, sob aumento de 400x (*DSAssistant*, Motic Inc., Richmond, BC, CAN), foram fotomicrografados cinco campos na região central das lesões. Em seguida, com o auxílio do programa ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health,

Bethesda, Maryland, USA), foi realizada a contagem das CM, CGMc e CGMnc imunomarcadas e negativas em cada um dos campos microscópicos. Os valores obtidos em cada um desses campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de CM, CGMc e CGMnc positivas em relação ao total de células contadas.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Os dados provenientes das análises das imunoeexpressões de Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos lesões. Possíveis correlações entre as imunoeexpressões das proteínas relacionadas à autofagia foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Imunoeexpressão de Atg7

Expressão citoplasmática de Atg7 foi observada em todos os casos de LPCG e LCCG, tanto em CM quanto em CGM, com altos percentuais medianos de positividade (Tabela 3; Fig. 1A-C). Nas CM, LCCG agressivas apresentaram imunoeexpressão significativamente superior para essa proteína quando comparadas a LCCG não agressivas ($p = 0,041$) (Fig. 2A). Em relação às CGMc e CGMnc, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de positividade citoplasmática para Atg7 entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 3A e 4A).

Constatou-se expressão nuclear de Atg7 em todos os casos analisados, tanto em CM quanto em CGMnc, com baixos percentuais medianos de positividade (Tabela 3; Fig. 1A-C). Em relação às CGMc, foi observada imunoeexpressão nuclear dessa proteína em todas as LPCG e LCCG agressivas, bem como, na maioria das LCCG não agressivas ($n = 9$; 90%). Nas CM, LCCG agressivas demonstraram percentuais de positividade significativamente superiores em comparação às LPCG ($p = 0,005$) (Fig. 2B). Em CGMc e CGMnc, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade nuclear para Atg7 entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 3B e 4B).

Imunoexpressão de LC3A

Expressão citoplasmática de LC3A foi constatada em todos os casos de LPCG e LCCG, tanto em CM quanto em CGM, com altos percentuais medianos de positividade (Tabela 3; Fig. 5A-C). Nas CM, LCCG não agressivas demonstraram percentuais de positividade significativamente inferiores para essa proteína quando comparadas às LPCG ($p = 0,041$) e LCCG agressivas ($p = 0,049$) (Fig. 2A). Em relação às CGMc e CGMnc, não houve diferença estatisticamente significativa nos percentuais de positividade citoplasmática para LC3A entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 3A e 4A).

Quanto à imunoexpressão nuclear de LC3A, foram identificados baixos percentuais medianos de positividade em LPCG e LCCG, independentemente do tipo celular analisado (Tabela 3; Fig. 5A-C). Em CM, todos os casos de LPCG e LCCG apresentaram imunorreatividade nuclear para LC3A. Nas CGMnc, houve expressão nuclear em todos os casos de LPCG, bem como, na maioria das LCCG agressivas ($n = 08$; 80%) e não agressivas ($n = 08$; 80%). Imunopositividade nuclear para LC3A em CGMc foi identificada em todos os casos de LPCG, em 06 (60%) casos de LCCG agressiva e em 05 (50%) casos de LCCG não agressiva. Em CM e CGMnc, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunopositividade nuclear para LC3A entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 2B e 4B). Nas CGMc, as LPCG apresentaram maiores percentuais de positividade nuclear para LC3A quando comparadas às LCCG agressivas ($p = 0,036$) (Fig. 3B).

Imunoexpressão de LC3B

Imunorreatividade citoplasmática para LC3B foi observada em todos os casos de LPCG e LCCG, tanto em CM quanto em CGM, com altos percentuais medianos de positividade (Tabela 3; Fig. 6A-C). Comparadas às LCCG não agressivas, as LPCG apresentaram maiores percentuais de imunopositividade para essa proteína, tanto em CM ($p = 0,007$) quanto em CGMnc ($p = 0,034$) (Figs. 2A e 4A). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas em relação à imunoexpressão de LC3B em CGMc ($p > 0,05$) (Fig. 3A).

Expressão nuclear de LC3B foi observada em todos os casos de LPCG e LCCG, tanto em CM quanto em CGM (Tabela 3; Fig. 6A-C). Nas CM, foram constatados maiores percentuais de imunopositividade para essa proteína em LPCG quando comparadas às LCCG agressivas e LCCG não agressivas, com diferença estatisticamente significativa em relação a estas últimas ($p = 0,049$) (Fig. 2B). Em CGMc e CGMnc, não houve diferença estatisticamente

significativa nos percentuais de positividade nuclear para LC3B entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 3B e 4B).

Imunoexpressão de p62

Expressão citoplasmática de p62 foi observada em todos os casos de LPCG e LCCG, tanto em CM quanto em CGM, com altos percentuais medianos de positividade (Tabela 3; Fig. 7A-C). Em comparação às LCCG não agressivas, as LPCG apresentaram maiores percentuais de positividade para essa proteína, tanto em CM ($p = 0,034$) quanto em CGMnc ($p = 0,034$) (Figs. 2A e 4A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas em relação à imunoexpressão de p62 em CGMc ($p > 0,05$) (Fig. 3A).

Constatou-se imunorreatividade nuclear para p62 em todos os casos analisados, tanto em CM quanto em CGM (Tabela 3; Fig. 7A-C). Para todos os tipos celulares avaliados (CM, CGMc e CGMnc), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade nuclear para p62 entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 2B, 3B e 4B).

Imunoexpressão de p-mTOR

Em CM e CGMc, expressão citoplasmática de p-mTOR foi mais frequente nas LPCG quando comparadas às LCCG não agressivas e agressivas (Tabela 3; Fig. 8A-C). Nas CGMnc, foi constatada positividade citoplasmática para essa proteína foi constatada em 06 (60%) casos de LCCG agressiva, 04 (40%) casos de LCCG não agressiva e 04 (40%) caso de LPCG (Tabela 3; Fig. 8A-C). Para todos os tipos celulares, independente do grupo analisado, foram observados baixos percentuais medianos de positividade citoplasmática para p-mTOR. Em comparação às LCCG não agressivas, as LPCG apresentaram maiores percentuais de positividade para essa proteína em CGMc ($p = 0,036$) (Fig. 3A). Em CM e CGMnc, não houve diferença estatisticamente significativa nos percentuais de positividade citoplasmática para p-mTOR entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 2A e 4A).

Para todos os tipos celulares, imunoexpressão nuclear de p-mTOR foi identificada em uma menor proporção dos casos de LPCG e LCCG, com baixos percentuais medianos de positividade (Tabela 3; Fig. 8A-C). Para todos os tipos celulares (CM, CGMc e CGMnc), não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de

imunorreatividade nuclear para p-mTOR entre LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas ($p > 0,05$) (Figs. 2B, 3B e 4B).

Correlação entre as imunorexpressões de Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em LPCG

Nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas, foram identificadas correlações estatisticamente significativas entre as imunorexpressões das proteínas relacionadas à autofagia. Essas correlações, de acordo com os tipos celulares (CM, CGMc e CGMnc), se encontram sumarizadas nas tabelas suplementares 1, 2 e 3.

Discussão

Os mecanismos relacionados a patogênese de lesões com CGM, em especial LCCG, são discutidas na literatura [1, 3, 4, 9, 10]. Nesse cenário, estudos têm sinalizado a importância do processo autofágico na modulação óssea [11, 12]. O seu papel na osteoclastogênese é complexo [11]. Sugere-se que condições de estresse local, como hipóxia e pressão, facilitam a autofagia dos osteoclastos por meio da ativação de *NFATC1*, marcador chave para osteoclastogênese e MMP-9 [15]. Por outro lado, seu papel na diferenciação dos osteoblastos é relacionado as proteínas autofágicas BECN1, Atg5 e Atg7 que são necessárias para a mineralização de células osteoblásticas [15]. Apesar dos achados, a sua participação no desenvolvimento das LPCG e LCCG ainda não havia sido investigada.

Esse processo catabólico é mediado por um complexo grupo de proteínas [25]. Na modulação da autofagia, a família Atg, em especial Atg7, participa da indução da formação do autofagossomo [16]. A LC3, nas suas duas isoformas, LC3A e LC3B, são responsáveis pelo alongamento autofagossomo [26], a p62 é um importante sinalizador para moléculas que serão degradadas [27] e p-MTOR é considerado o inibidor do processo autofágico [23]. No presente estudo, foi constatada alta imunorexpressão citoplasmática em CMs, CGMc e CGMnc das proteínas Atg7, LC3A, LC3B e p62 em todos os grupos de lesões estudadas e baixa imunorexpressão citoplasmática em CMs, CGMc e CGMnc de p-MTOR nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas. Em conjunto, tais resultados sugerem o envolvimento da autofagia na patogênese de LPCG e LCCG, todavia não parece estar relacionada ao comportamento biológico das LCCG.

Foram constatados nesse trabalho altos níveis de expressão citoplasmática de Atg7 nas CM, CGMc e CGMnc em LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas. Estudos progressos demonstraram que a família Atg5, Atg7 e Atg4B podem, ao direcionar LC3 para locais

específicos, impedir a fusão indiscriminada de lisossomos às membranas intracelulares. Além disso, Atg5, Atg7 e Beclin 1 são relacionadas a formação de bordas onduladas e na promoção da polarização dos osteoclastos que eventualmente levam à reabsorção óssea [15]. Resultados semelhantes foram verificados por Deselm et al. [28]. Os autores discutem que na ausência de Atg7, ocorre a inibição da conversão de LC3I em LC3II e por consequência, a diminuição da capacidade de reabsorção óssea. Em conjunto, esses achados sugerem a participação dessa proteína na indução autofágica no processo de osteoclastogênese.

Na análise comparativas entre os grupos de lesões estudadas, pode ser observado que as LPCG e LCCG agressivas apresentaram maior expressão citoplasmática de Atg7 e LC3A quando comparado a LCCG não agressivas. Esses resultados podem ser discutidos baseado na natureza reacional da LPCG. O papel da autofagia no processo inflamatório é discutido na literatura [29]. Nessa perspectiva, a pesquisa de Huang et al. [30] discute a participação da família Atg5-12 e LC3II associada à hipóxia na participação de um potencial causador no desenvolvimento e manutenção de lesões periapicais de origem inflamatória através das vias de sinalização *pAMPK/mTOR* ou *HIF-1 α /BNIP3*.

A proteína LC3B apresentou alta imunexpressão citoplasmática em LPCG e LCCG. O estudo de Zhang et al. [31] discute as funções de LC3B na modulação da osteoclastogênese. Os autores apontam que para que ocorra a migração dos osteoclastos, é necessária a montagem e desmontagem sucessivas e rápidas dos anéis de podossoma. Esse processo depende da interação da proteína kindlin3 com LC3B. Desse modo, o estudo sugere que LC3B é necessária para a renovação do podossoma e a migração dos osteoclastos. No presente estudo, também foi observada uma potencial participação da proteína LC3B na patogênese de lesões com CGM.

Na análise celular realizada por esse estudo, destaca-se as CM e CGM. As CGM possuem características semelhantes aos osteoclastos e são derivadas das CM que passaram por diferenciação e ativação sob a influência de vias de sinalização com *NF- κ B*, *RANKL*, *NFATc1*. Em conjunto, essas células podem modular a osteoclastogênese e a remodelação óssea. O papel autofágico em células mononucleadas e osteoclasticas em doenças ósseas foi investigado [32]. Os autores discutem que sob condição de estresse, os osteoclastos apresentam interação citoplasmática funcional entre p62 e a proteína ligada a autofagia (*FYVE*). Em especial, os osteoclastos maduros apresentaram formação mais rápida de agregados, sugerindo que os osteoclastos podem ter uma maior dependência autofágica para manter a função celular quando comparados as CM.

As proteínas autofágicas são expressas predominantemente no citoplasma das células [20]. Entretanto, na presente pesquisa, foi verificada alta expressão nuclear das proteínas LC3B e p62 em CM, CGMc, CGMnc nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas. A função nuclear de LC3B na modelação óssea ainda não é completamente esclarecida na literatura. Todavia, os achados dessa pesquisa podem ser discutidos a partir da participação da LC3B na translocação de material nuclear danificado para o citoplasma para degradação autolisossomal [33]. Por outro lado, p62 pode ter um importante papel na osteoclastogênese. A pesquisa de Wang et al. [15] discutem o seu papel na diferenciação osteoclástica induzida por *TNFSF11*, que funciona ativando o fator de transcrição associado à osteoclastogênese *NFATC1* e a sinalização *NFKB/NF-κB*.

No cenário da análise da imunorreatividade nuclear da p62, mas sob outra perspectiva, no presente estudo, foi observada imunoexpressão em todos os tipos celulares avaliados nas LPCG e LCCG agressivas e não agressivas. Esses achados podem ser discutidos baseado nas funções não autofágicas da p62. De acordo com Havaki et al. [34], p62 se desloca entre o núcleo e o citoplasma de forma rápida e constantemente. Uma vez exercendo funções nucleares, pode estar envolvida na degradação proteassomal e o recrutamento de proteínas nucleares poliubiquinizadas. Além disso, o estudo de Komatsu et al. [35] relata que p62 funciona como um centro de sinalização em várias vias de transdução, como a sinalização do NF-κB, na ativação da apoptose e na resposta ao estresse ambiental, desse modo contribuindo para a tumorigênese. Dessa forma, novas pesquisas se fazem necessárias para avaliar o papel dessa proteína na patogênese das LPCG e LCCG.

Apesar dos importantes achados da presente pesquisa, algumas limitações devem ser consideradas. Nesse cenário, ressalta-se o tamanho relativamente pequeno da amostra. Além disso, a técnica imunoistoquímica pode ser limitada para a análise de um processo dinâmico como a autofagia. Desse modo, o acúmulo de componentes que não são degradados durante o processo autofágico pode refletir um bloqueio na autofagia ou um alto turnover [36]. Destaca-se ainda as funções não autofágicas que as proteínas relacionadas a esse processo podem exercer, como a resposta de reparo de DNA [15].

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem um potencial envolvimento da autofagia na patogênese das LPCG e LCCG. No entanto, as diferenças no comportamento biológico de LLCG agressivas e não agressivas parecem não estar relacionadas a esse mecanismo intracelular catabólico. Além disso, por meio de funções nucleares não necessariamente relacionadas à autofagia, as proteínas LC3B e p62 podem contribuir para o

desenvolvimento das LPCG e LCCG. Os resultados aqui obtidos destacam a importância de novas investigações sobre o tema, que possam contribuir para a melhor compreensão do comportamento biológico das LCCG e para a elaboração de novas estratégias terapêuticas.

Referências

1. Zargar M, Baghaei F, Moghimbeigi A, Baghai F. Explanation for different behavior of peripheral and central giant cell granuloma by CD44 and CD34 immunostaining. *J Investig Clin Dent*. 2019; 10:12451. <https://doi.org/10.1111/jicd.12451>.
2. Hosur MB, Puranik RS, Vanaki SS, Puranik SR, Ingaleshwar PS. Clinicopathological profile of central giant cell granulomas: An institutional experience and study of immunohistochemistry expression of p63 in central giant cell granuloma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2021; 22:173–9. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_260_17.
3. Aksakalli, N. Evaluation of the osteopontin in oral peripheral and central giant cell granuloma. *Indian J Pathol Microbiol*. 2018; 61:18–21. https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_214_16. PMID: 29567878.
4. Mohtasham N, Saghravani N, Fatemi B, Vahedi M, Afzal-Aghaee M, Kadeh H. A comparative study of osteopontin and MMP-2 protein expression in peripheral and central giant cell granuloma of the jaw. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2019; 85:150–6. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2017.11.006>.
5. de Matos FR, de Moraes M, Nonaka CF, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Immunoexpression of TNF- α and TGF- β in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. *J Oral Pathol Med*. 2012; 41:194–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01075.x>.
6. Ramesh V. "Central giant cell granuloma" - An update. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020; 24:413–5. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_487_20.
7. Tahmasbi-Arashlow M, Patel PB, Nair MK, Liang H, Cheng YL. Cone-beam computed tomographic imaging of central giant cell granuloma: A comprehensive review. *Imaging Sci Dent*. 2022; 52:123–31. <https://doi.org/10.5624/isd.20220130>.
8. Chuong LB, Kaban H, Kozakewich A, Perez-Atayde. Central giant cell lesions of the jaws: A clinicopathologic study, *J Oral Maxillofac Surg*. 1986; 44:708–13. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(86\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0278-2391(86)90040-6).
9. Nagar SR, Bansal S, Jashnani K, Sinha A, Desai RS. A comparative analysis of p63 expression in giant cell tumour (GCT), central giant cell granuloma (CGCG) and peripheral

- giant cell granuloma (PGCG). *Head Neck Pathol.* 2020; 14:733–41. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01118-x>.
10. Bodhankar K, Bansal S, Jashnani K, Desai RS. Immunohistochemical expression of stem cell markers OCT-4 and SOX-2 in giant cell tumor, central giant cell granuloma, and peripheral giant cell granuloma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020; 130:78–84. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2020.03.052>.
 11. Montaseri A, Giampietri C, Rossi M, Riccioli A, Del Fattore A, Filippini A. The role of autophagy in osteoclast differentiation and bone resorption function. *Biomolecules.* 2020; 10:1398. <https://doi.org/10.3390/biom10101398>.
 12. Aoki S, Shimizu K, Ito K. Autophagy-dependent mitochondrial function regulates osteoclast differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 4:874–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.155>.
 13. Guo YF, Su T, Yang M, et al. The role of autophagy in bone homeostasis. *J Cell Physiol.* 2021; 236:4152–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.30111>.
 14. Trojani MC, Santucci-Darmanin S, Breuil V, Carle GF, Pierrefite-Carle V. Autophagy and bone diseases. *Joint Bone Spine.* 2022; 89:105301. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2021.105301>.
 15. Wang J, Zhang Y, Cao J, et al. The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance. *Autophagy.* 2023; 8:1–19. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2186112>.
 16. Rangel M, Kong J, Bhatt V, Khayati K, Guo JY. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS J.* 2022; 289:7177–98. <https://doi.org/10.1111/febs.16125>.
 17. Leone RD, Amaravadi RK. Autophagy: a targetable linchpin of cancer cell metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013; 24:209–17. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.008>.
 18. Suzuki H, Tabata K, Morita E, et al. Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Structure.* 2014;22:47-58, <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.09.023>.
 19. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282:24131–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>.
 20. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011; 147:728–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>.
 21. Duran A, Amanchy R, Linares JF, et al. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell.* 2011; 1:134–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.038>.

22. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*. 2001; 554:1102–5. <https://doi.org/10.1126/science.1063518>.
23. Appuhamy JA, Nayananjalie WA, England EM, Gerrard DE, Akers RM, Hanigan MD. 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*. 2019; 1:419–29. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7189>.
24. Ouyang DQ, Liang LZ, Ke ZF, et al. Association between high expression of phosphorylated Akt and mammalian target of rapamycin and improved survival in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Head Neck*. 2017; 39:1145–54. <https://doi.org/10.1002/hed.24732>.
25. Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective. *Cell*. 2019; 10:11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>.
26. Yu X, Wu J, Wu Q, Sun S. Quantitative analysis of autophagy-related protein LC3B by quantum-dot-based molecular imaging. *Methods Cell Biol*. 2021; 165:177–85. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.12.007>.
27. Linnert J, Güler BE, Krzysko J, Wolfrum U. The adhesion G-protein-coupled receptor VLGR1/ADGRV1 controls autophagy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2023; [epub ahead of print]. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13869>.
28. DeSelm CJ, Miller BC, Zou W, et al. Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. *Dev Cell*. 2011; 15:966–74. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.016>.
29. Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy*. 2016; 12:245–60. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1071759>.
30. 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*. 2016; 2:e125–e45. <https://doi.org/10.1111/iej.12782>.
31. Zhang Y, Cui Y, Wang L, Han J. Autophagy promotes osteoclast podosome disassembly and cell motility through the interaction of kindlin3 with LC3. *Cell Signal*. 2020; 67:109505. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109505>.
32. Hocking LJ, Mellis DJ, McCabe PS, Helfrich MH, Rogers MJ. Functional interaction between sequestosome-1/p62 and autophagy-linked FYVE-containing protein WDFY3 in

- human osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402:543–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.076>.
33. Muciño-Hernández G, Acevo-Rodríguez PS, Cabrera-Benitez S, Guerrero AO, Merchant-Larios H, Castro-Obregón S. Nucleophagy contributes to genome stability through degradation of type II topoisomerases A and B and nucleolar components. *J Cell Sci.* 2023; 136(1):jcs260563. <https://doi.org/10.1242/jcs.260563>.
34. Havaki S, Vlachou V, Zampetidis CP, et al. Monitoring autophagy immunohistochemically and ultrastructurally during human head and neck carcinogenesis. Relationship with the DNA damage response pathway. *Int J Mol Sci* 2017; 7:1920. <https://doi.org/10.3390/ijms18091920>.
35. Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res.* 2012; 66:457–62. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.07.004>.
36. Humbert M, Morán M, de la Cruz-Ojeda P, et al. Assessing autophagy in archived tissue or how to capture autophagic flux from a tissue snapshot. *Biology.* 2020;9:59. <https://doi.org/10.3390/biology9030059>.

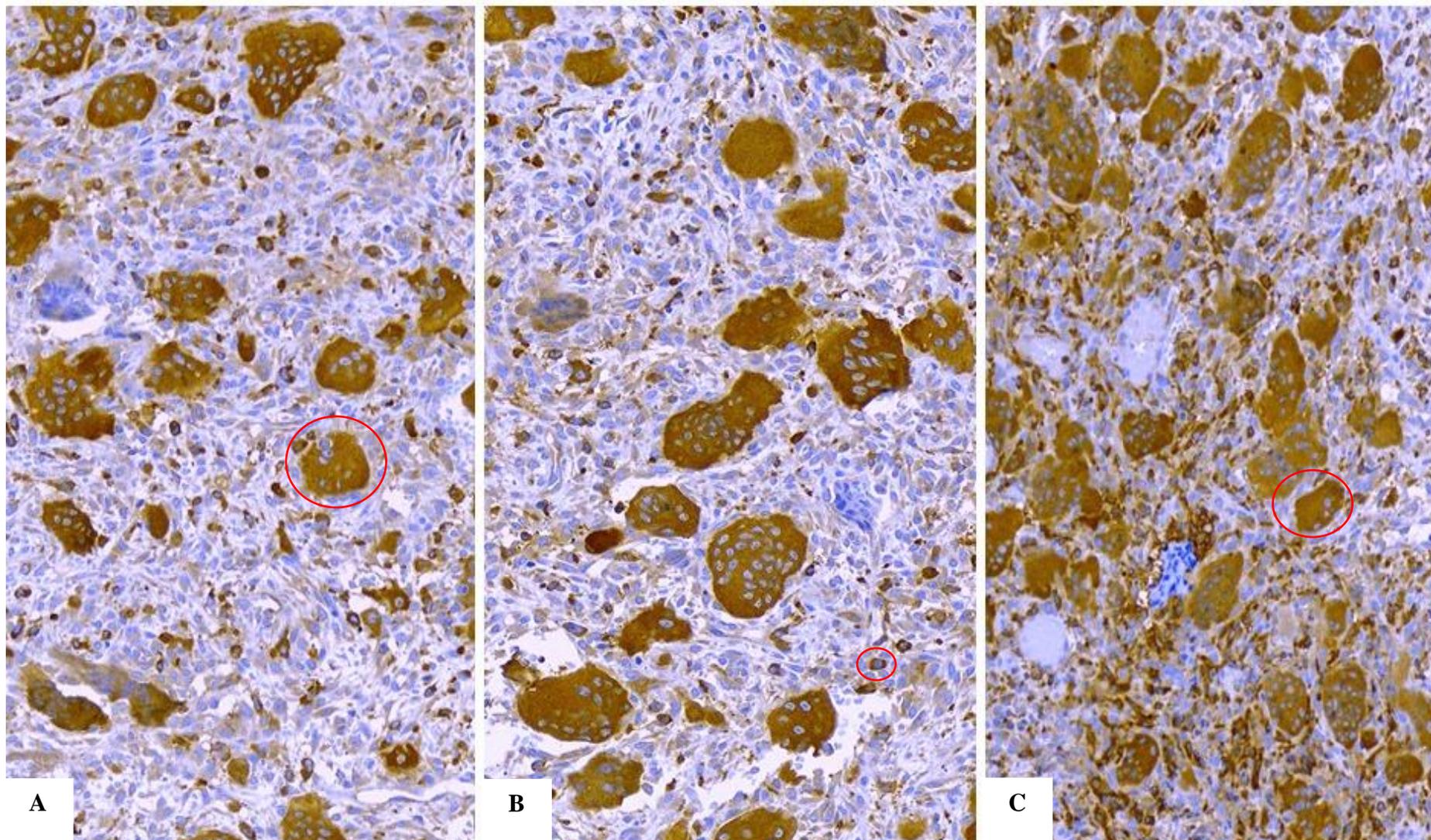


Fig. 1 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Atg7 nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (*EnVisionTM*, 200×). Destaque para a CGMc (A), CM (B) e CGMnc (C).

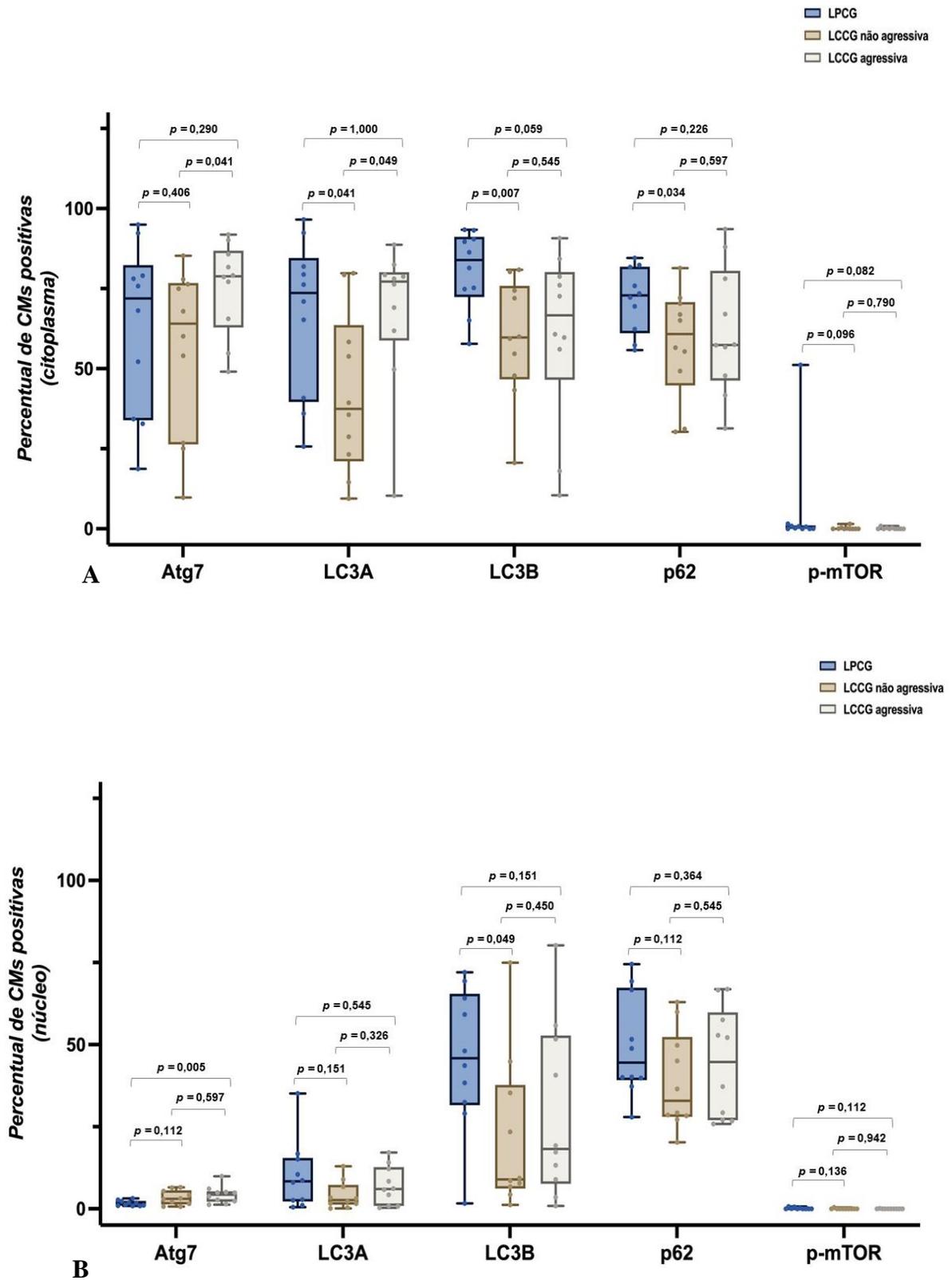


Fig. 2 Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em CM nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas.

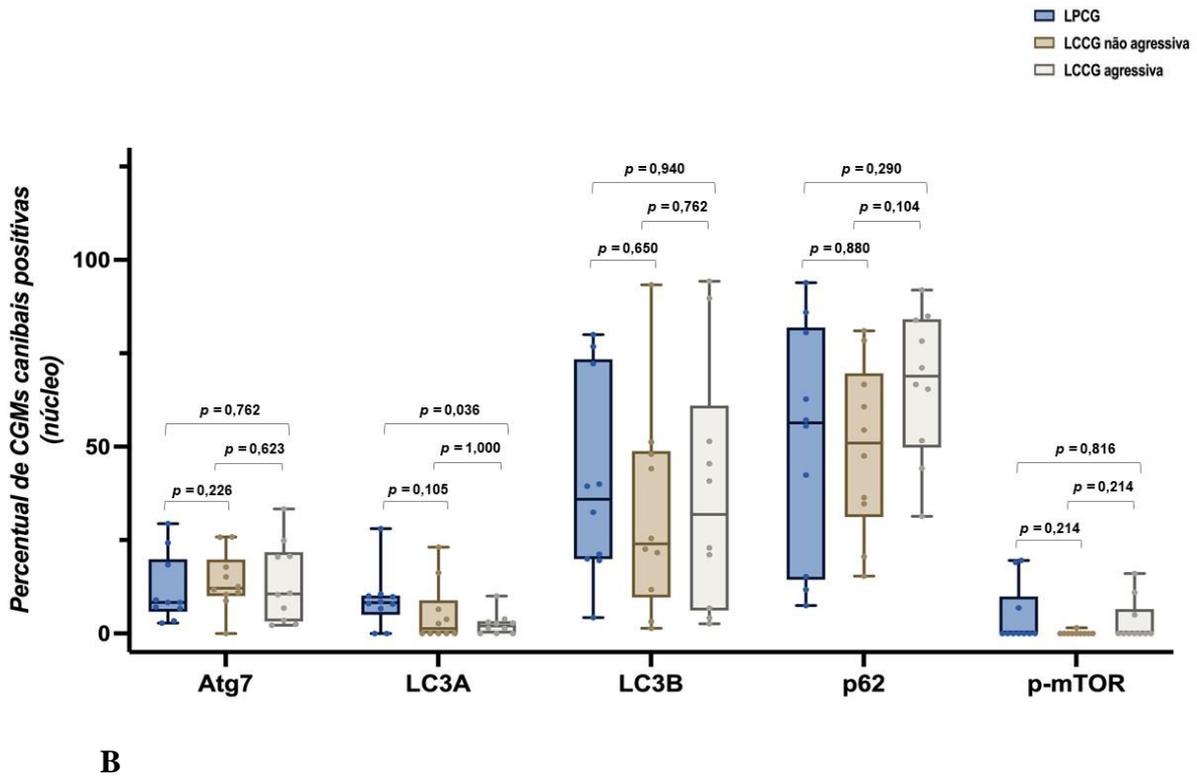
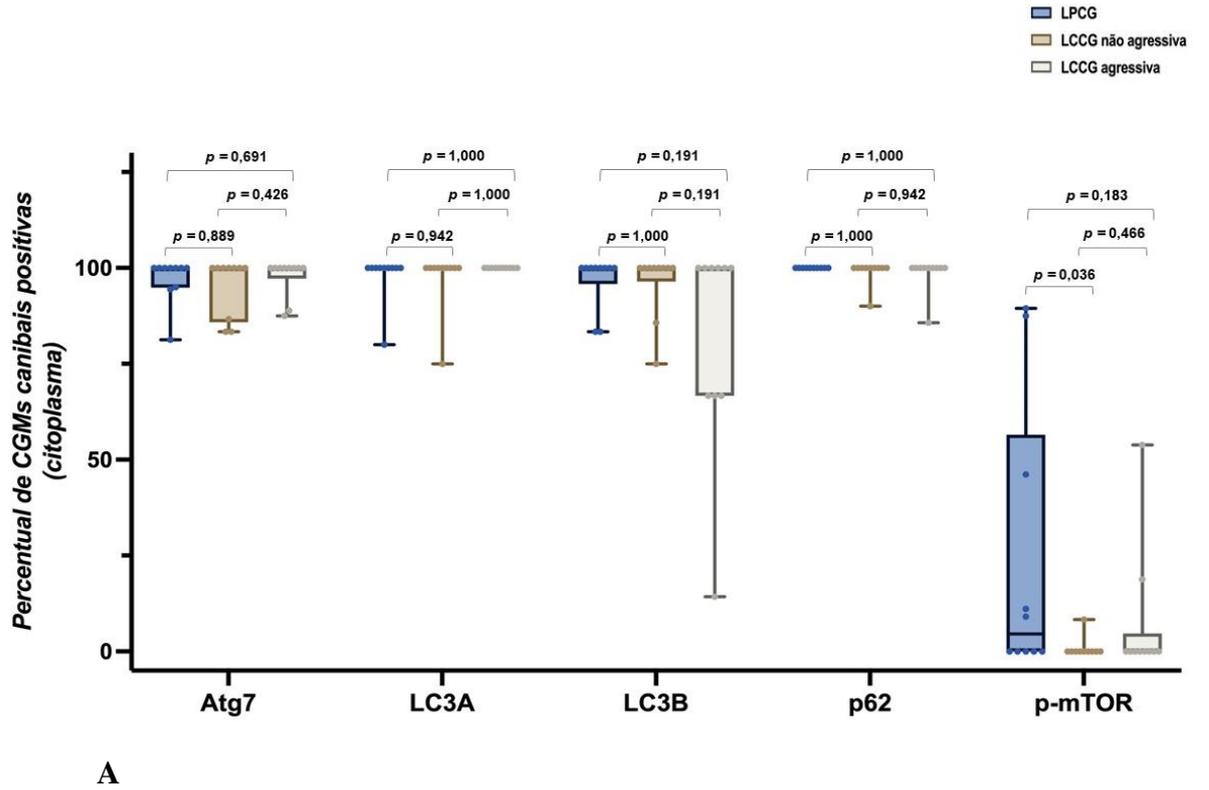


Fig. 3 Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em CGMc nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas.

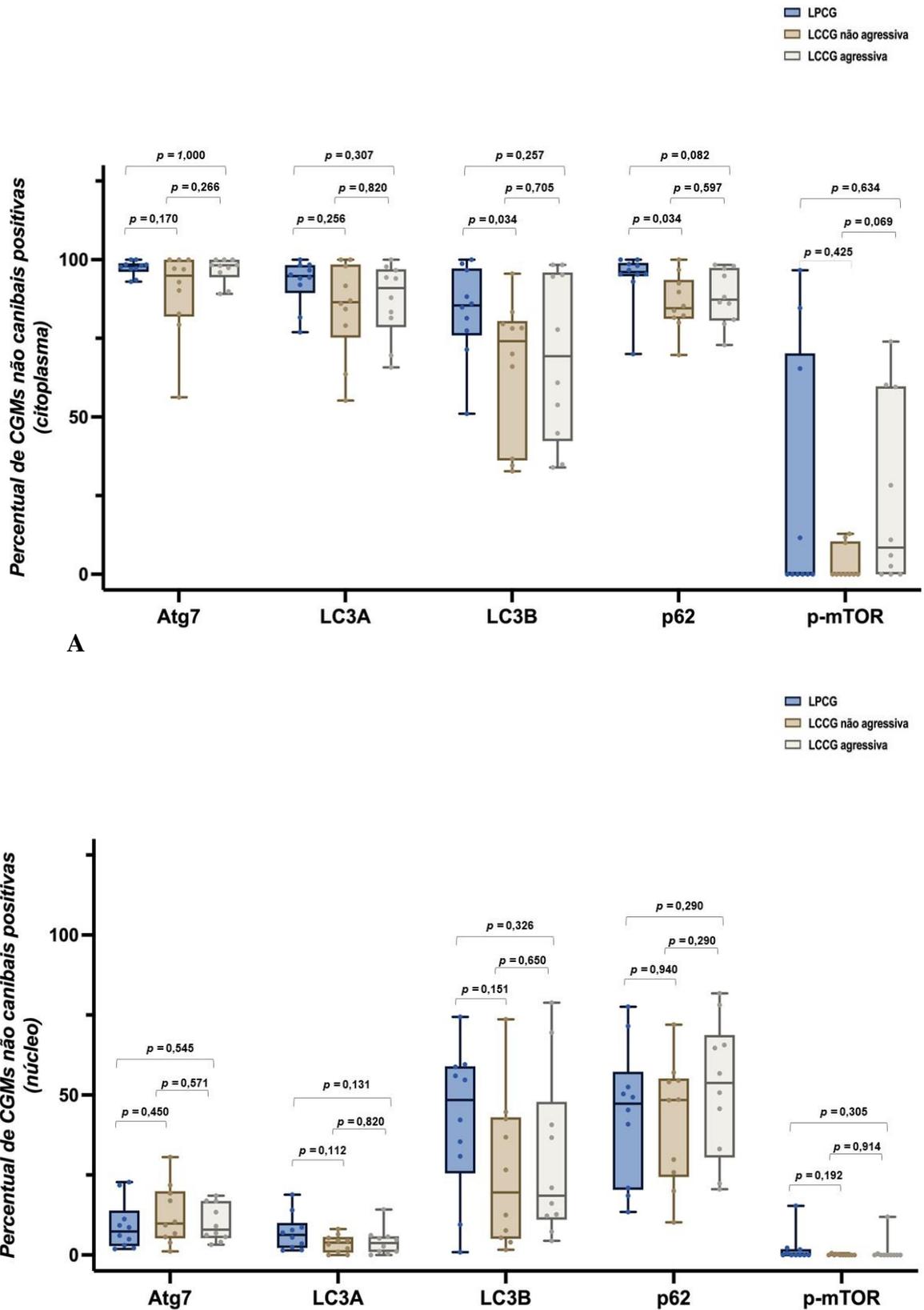


Fig. 4 I **B** lot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em CGMnc nas LPCG, LCCG não agressivas e LCCG agressivas.

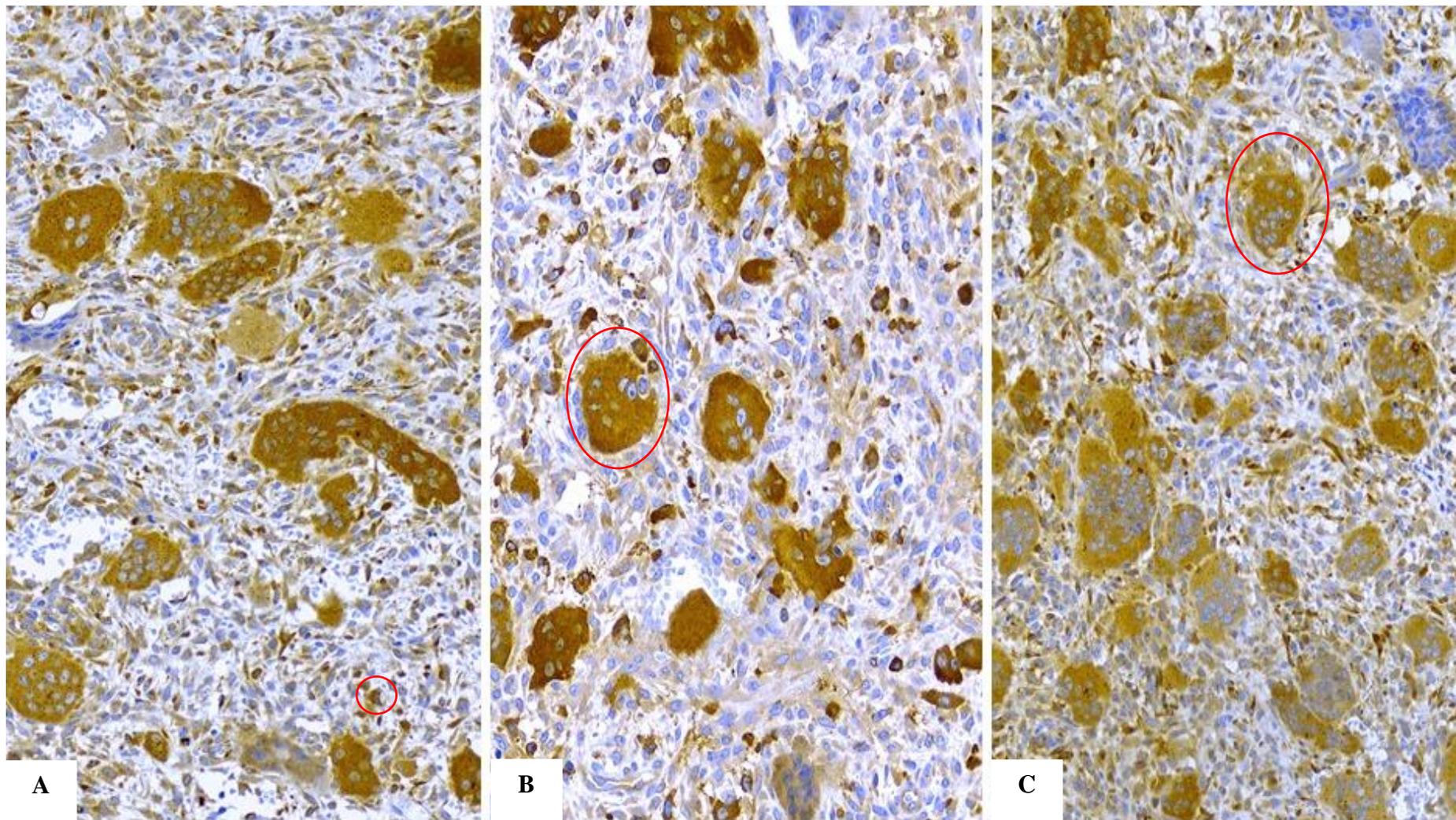


Fig. 5 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de LC3A nas CM, CGMc e CGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (*EnVisionTM*, 200×). Destaque para CM (A), CGMc (B) e CGMnc (C).

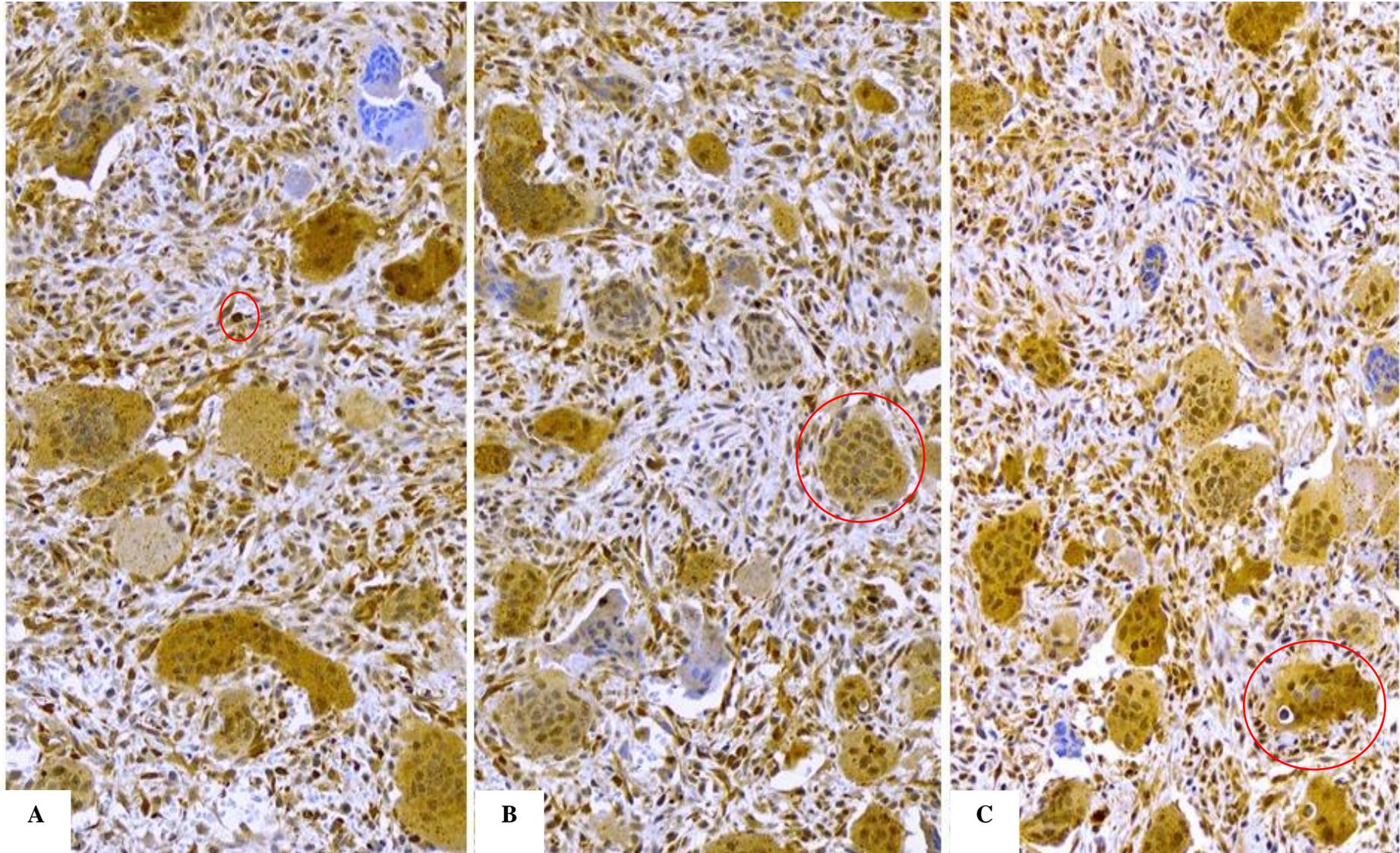


Fig. 6 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de LC3B nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (*EnVisionTM*, 200×). Destaque para CM (A), CGMnc (B) e CGMc (C).

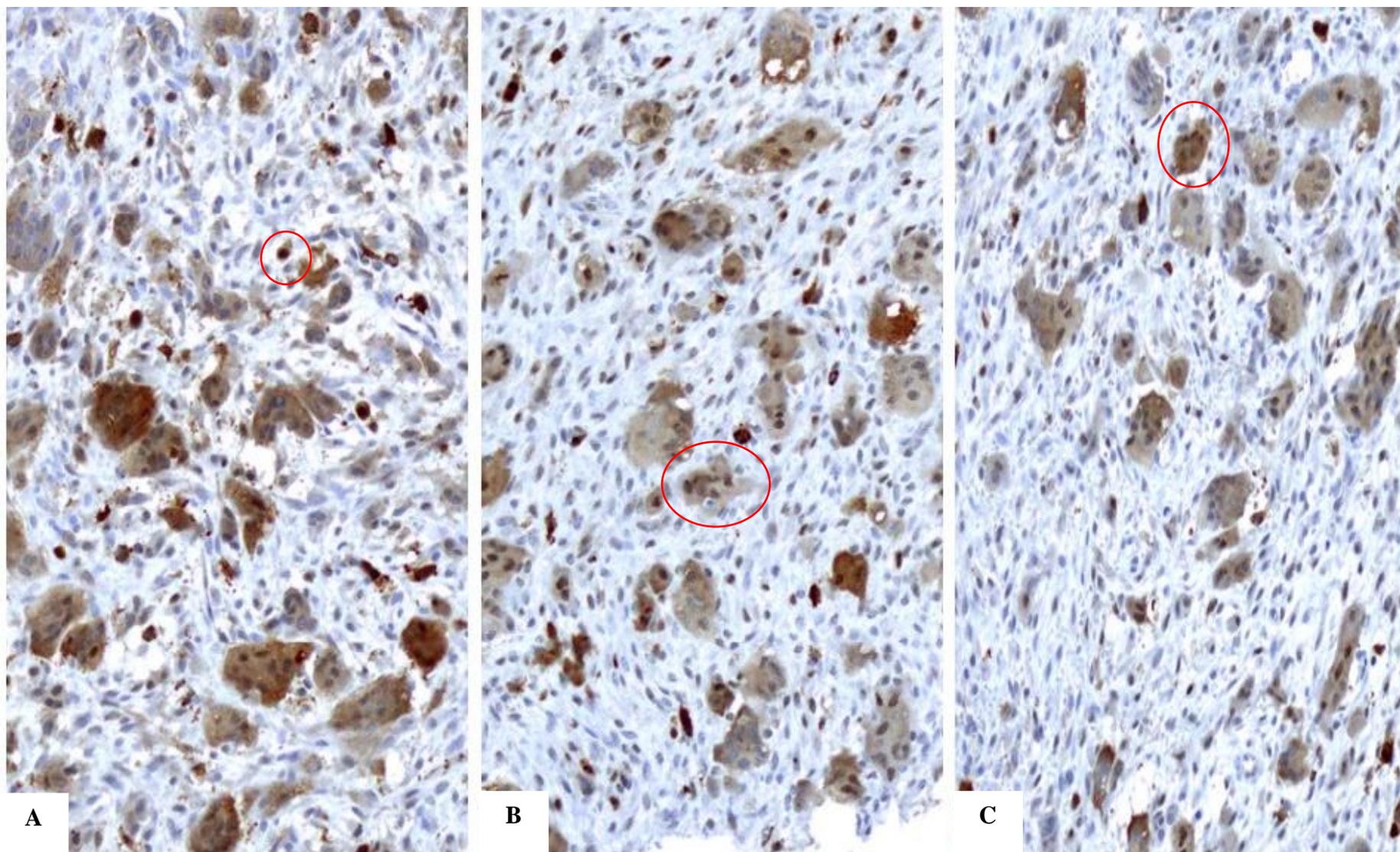


Fig. 7 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de p62 nas CM, CGMc e CGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (*EnVisionTM*, 200×). Destaque para CM (A), CGMc (B) e CGMnc (C).

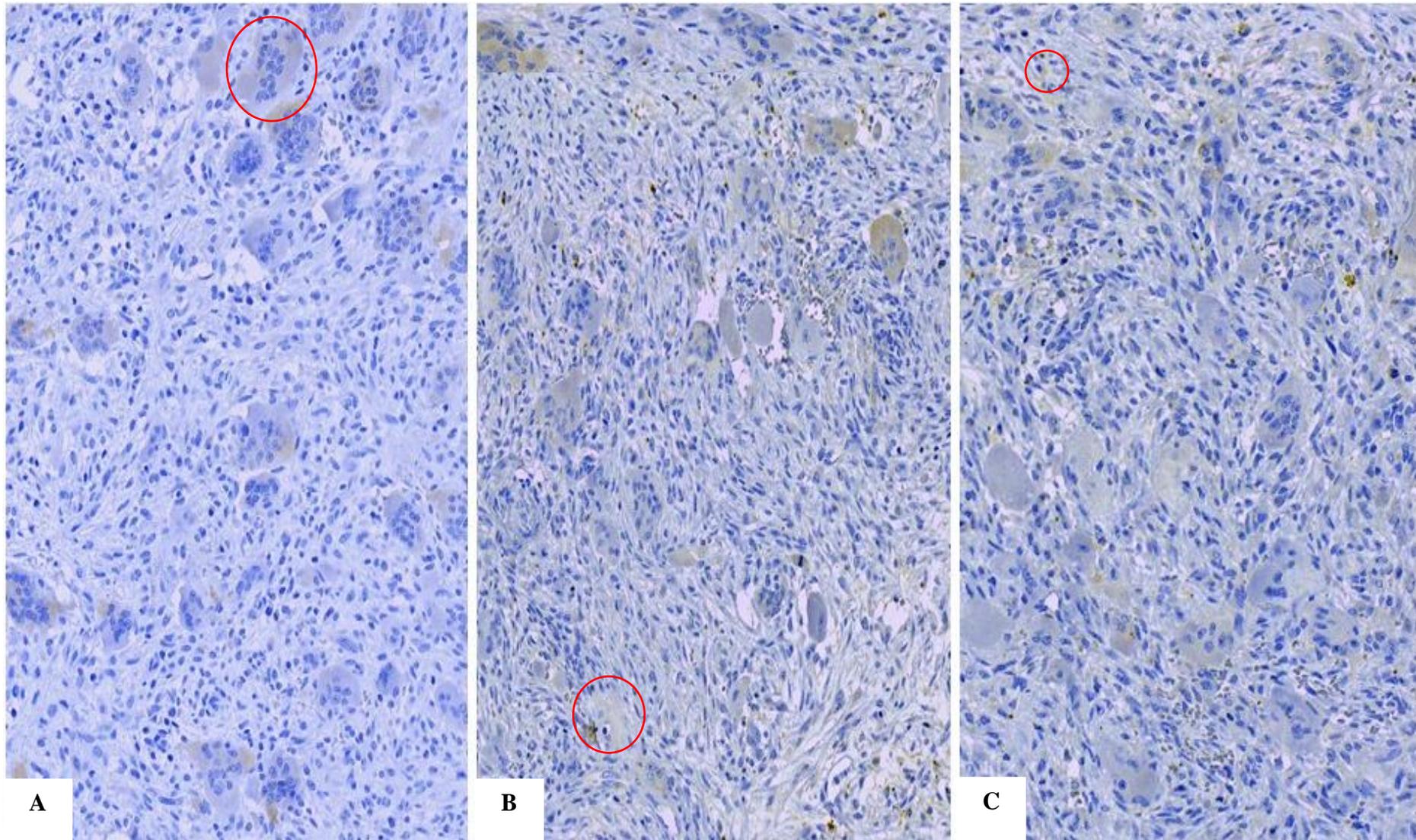


Fig. 8 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de p-mTOR nas CM, CGMc e CGGMnc em LPCG (A), LCCG não agressiva (B) e LCCG agressiva (C) (*EnVisionTM*, 200×). Destaque para CGMnc (A), CGMc (B) e CM (C).

Tabelas

Tabela 1. Distribuição dos casos de LPCG, LCCG não agressiva e LCCG agressiva de acordo com os dados clínicos.

Dados clínicos	LPCG	LCCG não agressiva	LCCG agressiva
<i>Idade (em anos)</i>			
Variação	7 – 55	15 - 78	10 – 46
Média ± desvio padrão	36,5 ± 16,3	32,5 ± 19,2	19,5 ± 13,8
<i>Sexo</i>			
Feminino	4 (40,0%)	6 (60,0%)	4 (40,0%)
Masculino	6 (60,0%)	4 (40,0%)	6 (60,0%)
<i>Localização</i>			
Maxila	5 (50,0%)	5 (50,0%)	4 (40,0%)
Mandíbula	5 (50,0%)	5 (50,0%)	6 (60,0%)

Tabela 2. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Atg7	ab52472	Abcam	1:750	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
LC3A	#4599	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
LC3B	#3868	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p62	ab56416	Abcam	1:600	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:200	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>

Tabela 3. Número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (núcleo e citoplasma) para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em relação as CM, CGMc e CGMnc.

<i>Proteína</i>	<i>Tipo de lesão</i>	Citoplasma		Núcleo	
		<i>Casos positivos (%)</i>	<i>Mediana (variação)</i>	<i>Casos positivos (%)</i>	<i>Mediana (variação)</i>
Atg7					
CM	LPCG	10 (100)	71,9 (18,7–94,9)	10 (100)	1,5 (0,9–3,2)
	LCCG não agressiva	10 (100)	64,0 (9,7–85,3)	10 (100)	3,1 (0,7–6,6)
	LCCG agressiva	10 (100)	78,8 (49,0–91,8)	10 (100)	4,3 (1,3–9,9)
CGMc	LPCG	10 (100)	100,0 (81,2–100,0)	10 (100)	8,3 (2,8–29,4)
	LCCG não agressiva	10 (100)	100,0 (83,3–100,0)	9 (90)	12,1 (0,0–25,8)
	LCCG agressiva	10 (100)	100,0 (87,5–100,0)	10 (100)	10,6 (2,2–33,3)
CGMnc	LPCG	10 (100)	97,9 (92,9–100,0)	10 (100)	7,4 (1,9–22,8)
	LCCG não agressiva	10 (100)	94,9 (56,2–100,0)	10 (100)	9,8 (1,1–30,6)
	LCCG agressiva	10 (100)	98,2 (89,1–100,0)	10 (100)	7,9 (3,2–18,5)
LC3A					
CM	LPCG	10 (100)	73,6 (25,7–96,5)	10 (100)	8,4 (0,5–35,0)
	LCCG não agressiva	10 (100)	37,4 (9,4–79,8)	10 (100)	2,7 (0,1–12,9)
	LCCG agressiva	10 (100)	77,2 (10,3–88,7)	10 (100)	6,0 (0,3–17,1)
CGMc	LPCG	8 (80)	100,0 (80,0–100,0)	10 (100)	8,2 (0,0–28,0)
	LCCG não agressiva	10 (100)	100,0 (75,0–100,0)	5 (50)	1,3 (0,0–23,0)
	LCCG agressiva	10 (100)	100,0 (100,0–100,0)	6 (60)	2,0 (0,0–10,0)
CGMnc	LPCG	10 (100)	94,7 (76,9–100,0)	10 (100)	6,2 (1,4–18,8)
	LCCG não agressiva	10 (100)	86,4 (55,2–100,0)	8 (80)	3,9 (0,0–8,1)
	LCCG agressiva	10 (100)	90,9 (65,7–100,0)	8 (80)	3,7 (0,0–14,2)
LC3B					
CM	LPCG	10 (100)	83,9 (57,7–93,4)	10 (100)	45,8 (1,6–72,0)
	LCCG não agressiva	10 (100)	59,7 (20,6–80,8)	10 (100)	8,9 (1,2–74,9)
	LCCG agressiva	10 (100)	66,6 (10,4–90,7)	10 (100)	18,2 (0,9–80,2)
CGMc	LPCG	10 (100)	100,0 (83,3–100,0)	10 (100)	35,9 (4,3–80,0)
	LCCG não agressiva	10 (100)	100,0 (75,0–100,0)	10 (100)	24,0 (1,4–93,3)
	LCCG agressiva	10 (100)	100,0 (14,2–100,0)	10 (100)	31,8 (2,6–94,2)
CGMnc	LPCG	10 (100)	85,4 (51,0–100,0)	10 (100)	48,4 (8,9–74,4)
	LCCG não agressiva	10 (100)	74,0 (32,7–95,5)	10 (100)	19,5 (1,6–73,6)
	LCCG agressiva	10 (100)	69,3 (33,9–98,3)	10 (100)	18,5 (4,4–78,8)
p62					
CM	LPCG	10 (100)	72,8 (55,8–84,5)	10 (100)	44,5 (27,9–74,4)
	LCCG não agressiva	10 (100)	60,8 (30,2–81,3)	10 (100)	32,8 (20,2–62,9)
	LCCG agressiva	10 (100)	57,4 (31,3–93,6)	10 (100)	44,6 (25,8–66,9)

CGMc	LPCG	10 (100)	100,0 (100,0–100,0)	10 (100)	56,3 (7,5–93,8)
	LCCG não agressiva	10 (100)	100,0 (90,0–100,0)	10 (100)	51,0 (15,3–81,0)
	LCCG agressiva	10 (100)	100,0 (85,7–100,0)	10 (100)	68,8 (31,3–91,9)
CGMnc	LPCG	10 (100)	96,0 (70,0–100,0)	10 (100)	47,3 (13,4–77,5)
	LCCG não agressiva	10 (100)	84,5 (69,7–100,0)	10 (100)	48,4 (10,1–72,0)
	LCCG agressiva	10 (100)	87,2 (72,8–98,3)	10 (100)	53,7 (20,5–81,7)
p-mTOR					
CM	LPCG	7 (70)	0,4 (0,0–51,1)	4 (40)	0,0 (0,0–0,7)
	LCCG não agressiva	4 (40)	0,0 (0,0–1,5)	1 (10)	0,0 (0,0–0,4)
	LCCG agressiva	2 (20)	0,0 (0,0–0,9)	1 (10)	0,0 (0,0–0,1)
CGMc	LPCG	5 (50)	4,5 (0,0–89,4)	3 (30)	0,0 (0,0–19,5)
	LCCG não agressiva	1 (10)	0,0 (0,0–8,3)	1 (10)	0,0 (0,0–1,5)
	LCCG agressiva	1 (10)	0,0 (0,0–53,8)	2 (20)	0,0 (0,0–16,0)
CGMnc	LPCG	40 (40)	0,0 (0,0–96,6)	4 (40)	0,0 (0,0–15,3)
	LCCG não agressiva	40 (40)	0,0 (0,0–12,9)	3 (30)	0,0 (0,0–0,5)
	LCCG agressiva	6 (60)	8,5 (0,0–73,9)	1 (10)	0,0 (0,0–11,9)

Tabela Suplementar 1. Coeficientes de correlação de Spearman (r) e respectivas significâncias estatísticas (p) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nas LPCG em CM, CGMc e CGMnc.

Componente celular/ proteínas	r	p
<i>CM</i>		
LC3A (citoplasma) x LC3A (núcleo)	$r = 0,939$	$p = 0,001$
LC3A (citoplasma) x LC3B (citoplasma)	$r = 0,758$	$p = 0,011$
Atg7 (citoplasma) x LC3B (citoplasma)	$r = 0,806$	$p = 0,005$
LC3B (citoplasma) x LC3B (núcleo)	$r = 0,636$	$p = 0,048$
p62 (citoplasma) x p62 (núcleo)	$r = 0,915$	$p = 0,001$
LC3B (citoplasma) x p-mTOR (citoplasma)	$r = 0,816$	$p = 0,004$
LC3A (citoplasma) x p-mTOR (citoplasma)	$r = 0,644$	$p = 0,044$
Atg7 (citoplasma) x p-mTOR (citoplasma)	$r = 0,644$	$p = 0,044$
<i>CGMc</i>		
LC3B (citoplasma) x p-mTOR (citoplasma)	$r = 0,718$	$p = 0,019$
Atg7 (citoplasma) x p-mTOR (citoplasma)	$r = - 0,803$	$p = 0,005$
p-mTOR (citoplasma) x p-mTOR (núcleo)	$r = 0,740$	$p = 0,014$
p62 (núcleo) x p-mTOR (núcleo)	$r = 0,710$	$p = 0,021$
<i>CGMnc</i>		
LC3A (citoplasma) x LC3A (núcleo)	$r = 0,770$	$p = 0,009$
p62 (citoplasma) x p62 (núcleo)	$r = 0,663$	$p = 0,037$
LC3A (núcleo) x p62 (núcleo)	$r = 0,818$	$p = 0,004$
p-mTOR (citoplasma) x p-mTOR (núcleo)	$r = 0,796$	$p = 0,006$

Tabela Suplementar 2. Coeficientes de correlação de Spearman (*r*) e respectivas significâncias estatísticas (*p*) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nas LCCG não agressivas em CM, CGMc e CGMnc.

Componente celular/ proteínas	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>CM</i>		
Atg7 (citoplasma) x Atg7 (núcleo)	<i>r</i> = 0,758	<i>p</i> = 0,011
LC3A (citoplasma) x LC3A (núcleo)	<i>r</i> = 0,661	<i>p</i> = 0,038
LC3B (citoplasma) x LC3B (núcleo)	<i>r</i> = 0,648	<i>p</i> = 0,043
LC3A (núcleo) x LC3B (núcleo)	<i>r</i> = 0,636	<i>p</i> = 0,048
p62 (citoplasma) x p62 (núcleo)	<i>r</i> = 0,661	<i>p</i> = 0,038
<i>CGMc</i>		
LC3A (citoplasma) x LC3B (citoplasma)	<i>r</i> = 0,745	<i>p</i> = 0,013
<i>CGMnc</i>		
LC3B (citoplasma) x LC3B (núcleo)	<i>r</i> = 0,818	<i>p</i> = 0,004

Tabela Suplementar 3. Coeficientes de correlação de Spearman (r) e respectivas significâncias estatísticas (p) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nas LCCG agressivas em CM, CGMc e CGMnc.

Componente celular/ proteínas	r	p
<i>CM</i>		
ATg7 (citoplasma) x LC3B (citoplasma)	$r = 0,636$	$p = 0,048$
Atg7 (citoplasma) x p62 (citoplasma)	$r = 0,709$	$p = 0,022$
LC3A (núcleo) x LC3B (núcleo)	$r = 0,891$	$p = 0,001$
<i>CGMc</i>		
LC3B (citoplasma) x LC3B (núcleo)	$r = 0,846$	$p = 0,002$
Atg7 (núcleo) x LC3A (núcleo)	$r = 0,681$	$p = 0,030$
LC3A (núcleo) x LC3B (núcleo)	$r = 0,865$	$p = 0,001$
p62 (núcleo) x p62 (núcleo)	$r = 0,697$	$p = 0,025$
<i>CGMnc</i>		
LC3A (citoplasma) x LC3B (citoplasma)	$r = 0,663$	$p = 0,037$
p62 (citoplasma) x p62 (núcleo)	$r = 0,794$	$p = 0,006$
Atg7 (núcleo) x LC3B (núcleo)	$r = 0,661$	$p = 0,038$
Atg7 (núcleo) x p-mTOR (núcleo)	$r = 0,683$	$p = 0,029$
Atg7 (núcleo) x LC3A (núcleo)	$r = 0,685$	$p = 0,029$

Considerações finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As LPCG e LCCG revelam semelhanças histológicas, apesar de apresentarem diferenças importantes em relação à etiopatogênese e ao comportamento biológico. Embora seja crescente o número de estudos que investigam essas lesões de forma comparativa, os mecanismos responsáveis por tais diferenças ainda não são completamente compreendidos. Nesse contexto, os resultados deste estudo sugerem uma potencial participação da autofagia na patogênese das LPCG e LCCG. Por outro lado, as diferenças no comportamento biológico de LLCG agressivas e não agressivas parecem não estar relacionadas a esse mecanismo intracelular catabólico.

Aparentemente, a nucleofagia não constitui um mecanismo relevante na patogênese das lesões de células gigantes analisadas. No entanto, os achados desta pesquisa sugerem que as proteínas LC3B e p62, por meio de funções nucleares não relacionadas à autofagia, podem contribuir para o desenvolvimento das LPCG e LCCG.

Uma compreensão abrangente dos diferentes papéis das proteínas relacionadas à autofagia nas LPCG e LCCG se faz necessária. Ressalta-se, nesse sentido, a importância de futuras análises comparativas com outras lesões de células gigantes potencialmente agressivas, como o tumor de células gigantes dos ossos longos. Ao tempo em que contribuirão para um melhor entendimento da patogênese e do comportamento biológico das lesões de células gigantes, os resultados dessas pesquisas podem alicerçar a elaboração de novas estratégias terapêuticas para esses processos patológicos.

Referências

REFERÊNCIAS

- AKINYAMOJU, A. O.; SOYELE, O. O.; SAIKI, T. E.; ADESINA, O. M. Giant cell lesions of the jaws: a review and comparative histopathological study. **West Afr J Med.**, v. 37, n. 1, p. 26-31, 2020.
- AKSAKALLI, N. Evaluation of the osteopontin in oral peripheral and central giant cell granuloma. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 61, n. 1, p. 18-21, 2018.
- AOKI, S.; SHIMIZU, K.; ITO, K. Autophagy-dependent mitochondrial function regulates osteoclast differentiation and maturation. **Biochem Biophys Res Commun** v. 527, n. 4, p. 874-880, 2020.
- 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, n. 1, p. 419–29, 2014.
- AHMADZADEH, K. *et al.* Multinucleation resets human macrophages for specialized functions at the expense of their identity. **EMBO Rep.**, v. 24, n. 3, e56310, 2023.
- ARGYRIS, P. P.; GOPALAKRISHNAN, R.; HU, Y.; REICHENBERGER, E. J.; KOUTLAS, I. G. Clinicopathologic and molecular characteristics of familial cherubism with associated odontogenic tumorous proliferations. **Head Neck Pathol.**, v.12, n. 1, p. 136-144, 2018.
- ALISSAFI, T. *et al.* Autophagy orchestrates the regulatory program of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. **J Clin Invest.**, v. 128, n. 9, p. 3840-3852, 2018.
- ATARBASHI MOGHADAM, S.; GHORBANPOUR, M. Evaluation of cyclin D1 expression in aggressive and nonaggressive central giant cell granuloma of the jaws. **J Dent (Shiraz).**, v. 19, n.4, p. 253-258, 2018.
- AUCLAIR, P. L. *et al.* clinical and histomorphologic comparison of the central giant cell granuloma and the giant cell tumor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 66, n. 2, p. 197-208, 1988.
- BATISTA SEVERO, M. L. *et al.* Immunoexpression of calcitonin and glucocorticoid receptors in central giant cell lesions of the jaws. **J Oral Pathol Med.**, v.47, n. 9, p. 907-913, 2018.
- BODHANKAR, K.; BANSAL, S.; JASHNANI, K.; DESAI, R. S. Immunohistochemical expression of stem cell markers OCT-4 and SOX-2 in giant cell tumor, central giant cell granuloma, and peripheral giant cell granuloma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.**, v. 130, n. 1, p. 78-84, 2020.
- BOYA, P.; KROEMER, G. Beclin 1: A BH3-only protein that fails to induce apoptosis. **Oncogene**, v. 28, n. 21, p. 2125-7, 2009.

- CHRCANOVIC, B. R.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Peripheral giant cell granuloma: An updated analysis of 2824 cases reported in the literature. **J Oral Pathol Med.**, v. 45, n. 5, p. 454-459, 2018.
- CHUONG, L.B.; KABAN, H.; KOZAKEWICH, A. PEREZ-ATAYDE, Central giant cell lesions of the jaws: A clinicopathologic study. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 44, n. 9, p. 708–713, 1986.
- 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, n. 7, p. e101579, 2014.
- GUO Y. F. *et al.* The role of autophagy in bone homeostasis. **J Cell Physiol.**, v. 236, n.6, p.4152-4173, 2021.
- CUERVO, A. M.; WONG, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. **Cell Res.**, v. 24, n. 1, p. 92-104, 2014.
- DENNIS, P. B. *et al.* Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1102–5, 2001.
- DESELM, C. J. *et al.* Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. **Dev Cell**, v. 15, p. 966-74, 2011.
- DUNLOP, E. A.; TEE, A. R. MTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 36, p. 121-9, 2014.
- DURAN, A. *et al.* p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. **Mol Cell.**, v. 44, n. 1, p. 134-46, 2011.
- EKICI, Ö.; AY, S.; AÇIKALIN, M. F.; PAŞAOĞLU, Ö. Immunohistochemical evaluation of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-17 cytokine expression in peripheral giant cell granuloma and peripheral ossifying fibroma of the jaws. **Arch Oral Biol.**, v. 136, p. 105385, 2022.
- FENG, Z. *et al.* The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 102, n. 23, p. 8204-9, 2005.
- FLAITZ, C. M. Peripheral giant cell granuloma: a potentially aggressive lesion in children. **Pediatr Dent.**, v. 22, n. 3, p. 232-233, 2000.
- FRIEDRICH, R. E, *et al.* KRAS mutation in an implant-associated peripheral giant cell granuloma of the jaw: implications of genetic analysis of the lesion for treatment concept and surveillance. **In Vivo**, v. 35, n. 2, p. 947-953, 2021.

FRUDD, K.; BURGOYNE, T.; BURGOYNE, J. R. Oxidation of Atg3 and Atg7 mediates inhibition of autophagy. **Nat Commun.**, v. 9, n. 1, p. 95, 2018.

GOMES, C. C. *et al.* TRPV4 and KRAS and FGFR1 gain-of-function mutations drive giant cell lesions of the jaw. **Nat Commun.**, v. 9, p. 4572, 2018.

GOMES, C. C. *et al.* Making sense of giant cell lesions of the jaws (GCLJ): lessons learned from next-generation sequencing. **J Pathol.**, v. 250, n. 2, p. 126-133, 2020.

GUO, Y. F. *et al.* The role of autophagy in bone homeostasis. **J Cell Physiol.**, v. 236, n. 6, p. 4152-4173, 2021.

GUIMARÃES, L, M *et al.* A new TRPV4 mutation in a case of multiple central giant cell granulomas of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.**, v. 21, n. 22, S2212-4403, 2022.

GWINN, D. M. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Mol Cell.**, v. 30, n. 2, p. 214–226, 2008.

HOSUR, M. B. *et al.* Clinicopathological profile of central giant cell granulomas: An institutional experience and study of immunohistochemistry expression of p63 in central giant cell granuloma. **J Oral Maxillofac Pathol.**, v. 22, n. 2, p. 173-179, 2018.

HOU, C. *et al.* Development and validation of autophagy-related gene signature and nomogram for predicting survival in oral squamous cell carcinoma. **Front Oncol.**, v. 10, p. 2260, 2020.

HOARAU E. *et al.* Oral giant cell tumor or giant cell granuloma: How to know? **Heliyon.**, v. 25, n. 3, e14087, 2023.

HOCKING, L. J. *et al.* Functional interaction between sequestosome-1/p62 and autophagy-linked FYVE-containing protein WDFY3 in human osteoclasts. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 402, n. 3, p. 543-548, 2010.

HUANG, H. Y. *et al.* The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions. **Int Endod J**, v. 2, e125-e145, 2018.

JI, L. *et al.* Autophagy exerts pivotal roles in regulatory effects of $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ on the osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 511, n. 4, p. 869-874, 2019.

JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. **Methods.**, v. 75, p. 13–8, 2015.

JING, Z. *et al.* Interaction of autophagy with microRNAs and their potential therapeutic implications in human cancers. **Cancer Lett.**, v. 356, n. 2, p. 332-8, 2015.

JUNG, G. H. *et al.* Chrysin induces apoptosis via the MAPK pathway and regulates ERK/mTOR-mediated autophagy in MC-3 cells. **Int J Mol Sci.**, v. 23, n. 24, p. 15747, 2022.

KHANNA, S. S.; MUNSHI, M. A. I.; KAUL, R. N.; SRINIVASAN, S. Quandary in diagnosing peripheral ossifying fibroma and pyogenic granuloma: a case report with mini review. **J Maxillofac Oral Surg.**, v. 20, n. 3, p. 439-42, 2021.

KLIONSKY, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 4, p. 445–544, 2012.

KOUKOURAKIS M. I. *et al.* Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. **PLoS One**, v. 10, n. 9, e0137675, 2015.

KOMATSU, M.; KAGEYAMA, S.; ICHIMURA, Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. **Pharmacol Res.**, v. 66, p.457-462, 2012.

LANGE, J.; VAN MAARLE, M. C.; VAN DEN AKKER, H. P.; REDEKER, E. J. DNA analysis of the SH3BP2 gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v. 45, n. 6, p. 499-500, 2007.

LATORRE, M. R. *et al.* Denosumab como tratamiento neoadyuvante del tumor de células gigantes del hueso. Indicaciones, resultados y efectos adversos [Denosumab as a treatment for giant cell tumor of bone. Indications, results and side effects]. **Medicina (B Aires)**, v. 81, n. 5, p. 767-773, 2021.

LEONE, R. D.; AMARAVADI, R. K. Autophagy: a targetable linchpin of cancer cell metabolism. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 24, n. 4, p. 209–17, 2013.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. **Cell Death Differ.**, v. 16, n. 1, p. 1-2, 2009.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Biological functions of autophagy genes: A Disease Perspective. **Cell.**, v. 179, n.1-2, p. 11-42, 2019.

LI, Z.; LI, D.; SU, H.; XUE, H.; TAN, G.; XU, Z. Autophagy: An important target for natural products in the treatment of bone metabolic diseases. **Front Pharmacol.**, v. 18, n. 13, p. 999017, 2022.

LINNERT, J.; GÜLER, B. E.; KRZYSKO, J.; WOLFRUM, U. The adhesion G-protein-coupled receptor *VLGR1/ADGRV1* controls autophagy. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** Apr 1, 2023.

LIU, W. *et al.* Autophagy and tumorigenesis. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1207, p. 275-299, 2020.

LUO, M.; ZHAO, X.; SONG, Y.; CHENG, H.; ZHOU, R. Nuclear autophagy: an evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. **Autophagy**, v. 12, p. 1973-1983, 2016.

- MARTINI, G.; CAPELLA, D.; RIVERO, E. R. C.; GONDAK, R. O. Immunohistochemical expression of RANKL in oral giant cell lesions is predictive of aggressiveness. **Braz Oral Res.**, v. 32, e115, 2018.
- MARTINS-CHAVES, R. R. *et al.* KRAS mutations in implant-associated peripheral giant cell granuloma. **Oral Dis.**, v. 26, n. 2, p. 334-340, 2020.
- MELO-MUNIZ, V. R. V. *et al.* Potential role of Hedgehog signaling pathway and myofibroblastic differentiation in central giant cell granuloma-A preliminary study. **J Oral Pathol Med.**, v. 48, n. 9, p. 855-860, 2019.
- MELO-MUNIZ, V. R. V. *et al.* Central giant cell granuloma: a clinicopathological and immunohistochemical study of macrophages, blood vessels, lymphatic vessels and regulatory proteins. **Ann Diagn Pathol.**, v. 46, p.151526, 2020.
- MENDONÇA, R. P *et al.* Central giant cell granuloma treated with intralesional corticosteroid injections and bisphosphonates: a long-term follow-up case study. **Head Neck Pathol.**, v. 14, n. 2, p. 497-502, 2020.
- MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728-41, 2011.
- MOHTASHAM, N. *et al.* A comparative study of osteopontin and MMP-2 protein expression in peripheral and central giant cell granuloma of the jaw. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 85, n. 2, p. 150-156, 2019.
- MONTASERI, A. *et al.* The role of autophagy in osteoclast differentiation and bone resorption function. **Biomolecules**, v.10, n. 10, p. 1398, 2020.
- MONTAZER, L. M. S.; FARZINNIA, G.; JAAFARI-ASHKAVANDI, Z. Clinicopathological study of 1000 biopsied gingival lesions among dental outpatients: a 22-year retrospective study. **BMC Oral Health.**, v. 22, n. 1, p.154, 2022.
- NAGAR, S.R.; BANSAL, S.; JASHNANI, K.; SINHA, A.; DESAI, R. S. A comparative analysis of p63 expression in giant cell tumour (GCT), central giant cell granuloma (CGCG) and peripheral giant cell granuloma (PGCG). **Head Neck Pathol.**, v. 14, n. 3, p. 733-741, 2020.
- NETEA-MAIER, R. T. *et al.* Autophagy in thyroid cancer: present knowledge and future perspectives. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 18, p. 22, 2015.
- NILESH, K.; DADHICH, A.; PATIL, R. Management of recurrent central giant cell granuloma of mandible using intralesional corticosteroid with long-term follow-up. **BMJ Case Rep.**, v. 13, n. 9, e237200, 2020.
- NIEDZIELSKA, I. *et al.* Bony canal method of dexamethasone injections in aggressive form of central giant cell granuloma-case series. **Medicina (Kaunas)**, v. 59, v. 2, p. 250, 2023.

NIE, J.; WANG, D.; LI, M. The crosstalk between autophagy and myeloid-derived suppressor cell responses in cancer. **Clin Transl Oncol.**, v. 11, 2023.

OLIVEIRA FILHO, S. A. *et al.* Angiogenesis pattern and H3.3 histone mutation in aggressive and non-aggressive central giant cell lesions. **Arch Oral Biol.**, v. 130, p. 105218, 2021.

PANKIV, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 33, p. 24131–45, 2007.

PARK, D. B, *et al.* Chrysophanol-induced autophagy disrupts apoptosis via the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. **Medicina (Kaunas).**, v. 59, n. 1, p. 42, 2022.

POGREL, M. A.; HOSSAINI-ZADEH, M. Denosumab for the management of central giant cell granuloma of the jaws-a case series. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 50, n. 8, p. 1019-1022, 2021.

POILLET-PEREZ L, *et al.* Autophagy maintains tumour growth through circulating arginine. **Nature**, v. 563, n. 7732, p. 369-573, 2018.

RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1344-8, 2010.

RACOMA, I. O. *et al.* Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e72882, 2013.

RAMESH V. "Central giant cell granuloma" - An update. **J Oral Maxillofac Pathol.**, v. 24, n. 3, p. 413-415, 2020.

RANGEL, M.; KONG, J.; BHATT, V.; KHAYATI, K.; GUO, J. Y. Autophagy and tumorigenesis. **FEBS J**, v. 289, n. 22, p. 7177-7198, 2022.

RAZAVI, S. M.; YAHYAABADI, R. Comparative study of correlation between angiogenesis markers (CD31) and Ki67 marker with behavior of aggressive and nonaggressive central giant cell granuloma with immunohistochemistry technique. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 19, n. 8, p. 2279-2283, 2018.

REN, Y. *et al.* An autophagy-related long non-coding RNA signature in tongue squamous cell carcinoma. **BMC Oral Health**, v. 23, n. 1, p. 120, 2023.

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, n. 5, p. 1662-75, 2014.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S. Cellular cannibalism in central and peripheral giant cell granuloma of the oral cavity can predict biological behavior of the lesion. **J Oral Pathol**

Med., v. 43, p. 459-63, 2014.

SARODE, G. S. *et al.* Cellular cannibalism in giant cells of central giant cell granuloma of jaw bones and giant cell tumors of long bones. **J Investig Clin Dent.**, v. 8, n. 2, 2017.

SUZUKI, H. *et al.* Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. **Structure.**, v. 22, n. 1, p. 47-58, 2014.

TAHMASBI-ARASHLOW, M.; PATEL, P. B.; NAIR, M. K.; LIANG, H.; CHENG, Y. L. Cone-beam computed tomographic imaging of central giant cell granuloma: A comprehensive review. **Imaging Sci Dent.**, v. 52, n. 2, p. 123-131, 2022.

TAN, Y. Q.; ZHANG, J.; ZHOU, G. Autophagy and its implication in human oral diseases. **Autophagy**, v. 13, n. 2, p. 225-236, 2017.

TOBÓN-ARROYAVE, S. I.; ISAZA-GUZMÁN, D. M.; FLÓREZ-MORENO, G. A. Immunohistochemical comparative study of aggressive and non-aggressive central giant cell lesions of the jaws based on the tenascin-C expression profile. **J Histochem Cytochem.**, v. 69, n. 7, p. 475-484, 2021.

TOFERER, A. *et al.* Dilemma in the treatment of a central giant cell granuloma. **J Clin Pediatr Dent.**, v. 45, n. 5, p. 337-340, 2021.

TROJANI, M. C.; SANTUCCI-DARMANIN, S.; BREUIL, V.; CARLE, G. F.; PIERREFITE-CARLE, V. Autophagy and bone diseases. **Joint Bone Spine.**, v.89, n. 3, p.105301, 2022.

URS, A. B.; YAMING, P.; MALHOTRA, R. An insight into the cannibalistic behavior of giant cell granulomas of the jaws. **J Oral Maxillofac Pathol.**, v. 22, n. 3, p. 449, 2018.

WANG, J. *et al.* The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance. **Autophagy**, v. 8, p. 1 -19, 2023

YANG, A. *et al.* Autophagy sustains pancreatic cancer growth through both cell-autonomous and nonautonomous mechanisms. **Cancer Discov.**, v. 8, n. 3, p. 276-287, 2018.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nat Cell Biol.**, v. 12, n. 9, p. 814-22, 2010.

YOSHIMORI, T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 313, n. 2, p. 453-8, 2004.

YOU, B. *et al.* AMPK-mTOR-mediated activation of autophagy promotes formation of dormant polyploid giant cancer cells. **Cancer Res.**, v. 82, n. 5, p. 846-858, 2022.

YOON, J. H.; LI, M.; BASILE, J. R.; LIN, Y. L. Computer-assisted analysis of immunohistological parameters in oral giant cell granulomas. **Oral Dis.**, v. 25, n. 3, p. 796-802, 2019.

YU, X.; WU, J.; WU, Q.; SUN, S. Quantitative analysis of autophagy-related protein LC3B by quantum-dot-based molecular imaging. **Methods Cell Biol.**, v. 165, p.177-185, 2023.

ZARGARAN, M.; BAGHAEI, F.; MOGHIMBEIGI, A.; BAGHAI, F. Explanation for different behavior of peripheral and central giant cell granuloma by CD44 and CD34 immunostaining. **J Investig Clin Dent.**, v. 10, n. 4, e.12451, 2019.

ZHANG, Y.; CUI, Y.; WANG, L.; HAN, J. Autophagy promotes osteoclast podosome disassembly and cell motility athrough the interaction of kindlin3 with LC3. **Cell Signal.**, v. 67, p. 109505, 2020.

Apêndices

APÊNDICE A – Ficha para coleta de dados referente à análise imunoistoquímica das proteínas relacionadas à autofagia em LCCG e LPCG.

Anticorpo: () Atg7 () p-mTOR () p62 () LC3A () LC3B

Localização: () Citoplasma () Núcleo **Componente celular:** () CM / CGMc / CGMnc

Caso	Campos microscópicos										Total		Percentual de células imunopositivas
	1		2		3		4		5				
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	

Anexos

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA / UEPB - PRPGP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMUNOEXPRESSIONÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA EM LESÕES DE CÉLULAS GIGANTES

Pesquisador: Cassiano Francisco Weege Nonaka

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66030022.4.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.825.726

Apresentação do Projeto:

O estudo consistirá em uma pesquisa observacional, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunorexpressões das proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em LPCGs, LCCGs e TCGs. A população do estudo será constituída por todos os casos de LPCG, LCCG e TCG, arquivados nos Laboratórios de Histopatologia Oral dos Departamentos de Odontologia da UEPB e da Universidade Federal Rio Grande do Norte (UFRN).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a imunorexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR) em LPCGs, LCCGs e TCGs.

Objetivos específicos:

Classificar os casos de LCCG com base em suas características clínicas e radiográficas (agressivas ou não agressivas);

Avaliar, morfológicamente, e quantificar as CGMs canibais em LPCGs, LCCGs e TCGs;

Determinar os percentuais de CGMs e CMs imunopositivas para as proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR nos casos de LPCG, LCCG e TCG;

Endereço: Av. das Barcinas, 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@reitor.uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA / UEPB - PRPG



Continuação do Parecer: 5.825.726

Analisar possíveis diferenças na imunexpressão das proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR em relação à agressividade das LCCGs;

Relacionar as imun-expressões das proteínas Atg7, LC3A, LC3B, p62 e p-mTOR com a morfologia/quantidade de CGMs canibais nas lesões de células gigantes;

Estabelecer correlações entre as imunexpressões das proteínas relacionadas à autofagia nos casos de LPCG, LCCG e TCG.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em se tratando de uma pesquisa que realizará a coleta de dados em fichas clínicas e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivo, os riscos potenciais implicados na participação nesta pesquisa são mínimos. Nesse contexto, deve-se considerar a possibilidade de exposição dos dados pessoais dos pacientes. Esse risco, no entanto, será minimizado pelo uso de codificações que garantirão a privacidade e confidencialidade dos dados, assegurando que não sejam utilizadas quaisquer indicações que possam identificar os participantes da pesquisa. Os benefícios podem superar os possíveis riscos, uma vez que tendem a contribuir ao conhecimento sobre o mecanismo de manutenção da viabilidade celular em lesões de células gigantes, avaliando o potencial participação de proteínas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta do projeto é relevante, a apresenta uma contribuição científica ao contribuir para o aprimoramento do conhecimento de proteínas relacionada a autofagia de lesões de células gigantes. Estes aspectos podem somar para o aprimoramento do conhecimento do mecanismo da lesão e conseqüente melhoria de diagnóstico e tratamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: anexada;

Autorização Institucional: Anexada

Termo de Compromisso do Pesquisador Responsável: anexado

Termo de autorização para uso de arquivo: anexado

Termo de concordância com a pesquisa: anexado

TCLE: justificado a ausência.

Endereço: Av. das Bananeiras, 351-Campus Universitário

Bairro: Bodocórego CEP: 58.109-753

UF: PB Município: CAMPINA GRANDE

Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@reitor.uepb.edu.br

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA / UEPB - PRPGP**



Continuação do Parecer: 5.625.736

Recomendações:

O projeto é relevante, apresenta importância acadêmica e social. A metodologia está clara e adequada ao que se propõe. Todos os termos foram anexados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta todos os documentos necessários, desta forma está aprovados salvo melhor entendimento.

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_BASICAS_DO_P ROJETO_2063/2017.pdf	09/12/2022 10:27:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JustificativaDispensa_TCLE.pdf	09/12/2022 10:25:11	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Outros	AutorizacaoInstitucional_UEPB.pdf	09/12/2022 10:24:55	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Outros	AutorizacaoInstitucional_ColetaDados_U EPB.pdf	09/12/2022 10:24:23	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Outros	AutorizacaoInstitucional_ColetaDados_U ERN.pdf	09/12/2022 10:23:56	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	09/12/2022 10:22:02	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Folha de Rosto	folhaDoRosto.pdf	09/12/2022 10:20:05	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. das Bananeiras, 351- Campus Universitário
 Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-713
 UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
 Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@utor.uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA / UEPB - PRPGP



Continuação do Parecer: 5.625.726

CAMPINA GRANDE, 19 de Dezembro de 2022

Assinado por:
Gabriela Maria Cavalcanti Costa
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Barúcas, 351 - Campus Universitário
Bairro: Bodocundi **CEP:** 58.109-753
UF: PB **Município:** CAMPINA GRANDE
Telefone: (81)3315-3373 **Fax:** (81)3315-3373 **E-mail:** cep@reitor.uepb.edu.br

ANEXO B. Normas para submissão de artigos ao periódico *Head and Neck Pathology*

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

General Information

Submissions are online via Springer's Editorial Manager electronic submission site at <https://www.editorialmanager.com/hanp/default2.aspx>. First time users must register in order to submit a manuscript. If you experience any trouble, please use the "CONTACT US" button on the tool bar, which will create an email from your local default email program.

Submission of a manuscript implies:

- that the work described has not been published before;
- that it is not under consideration for publication anywhere else;
- that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out

The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation. All manuscripts are evaluated via iThenticate for signs of any potential plagiarism. For information on the concept of self-plagiarism, visit the following online <http://www.ithenticate.com/resources/papers/ethics-of-self-plagiarism#>

ORCID ID

This publication requires that the corresponding author provides his/her ORCID ID before proceeding with submission. For more information about this journal's ORCID policy, please visit the ORCID FAQ

Types of Papers

Research

This section is the major emphasis of the journal, with a focus on head and neck pathology topics, and devoted to scientific reporting of results of original clinicopathologic research.

Review

Reviews present, contrast, and evaluate information from previously published research to address a specific question or topic related to the aims and scope of the journal.

Correspondence

Correspondences provide a format for discussions of matters associated with the publication. Correspondences are published at the discretion of the Editor and those presenting original material are subject to peer review. Correspondences are written without subheadings and have a maximum length of 1,000 words and 5-10 pertinent references.

Case Report

In general, case reports are not encouraged and the editors strictly limit the number of case reports per issue. For the Editors to consider a case report it must contain all pertinent clinical, imaging, pathology, and ancillary information on a particularly novel or exceedingly rare entity, set within the context of a thorough and investigative review of the literature. Submissions of single case reports or limited series of common entities will be rejected and returned to the author.

Comment

These can portray your view on a topical or controversial subject in the field, as well as anything of likely interest to the readers, such as policy debates and community announcements. Please note supplementary information will not be accepted as part of the submission.

No abstract required; Main body of text (excluding references, tables/figures, figure legends) not to exceed 1,500 words; Max 2 table or figure; Max 15 references.

Perspective

A scholarly overview and discussion of the primary research literature that does not meet the criteria for a review article - either because the scope is too narrow, or a primary purpose of the piece is to advocate a controversial position or a speculative hypothesis, or to discuss work primarily from one or a few research groups. They are intended to stimulate discussion and consideration of new approaches to investigation and understanding of a field.

Unstructured abstract max. 250 words; Max of 4 tables or figures; Max 25 references.

Image

Submissions to this section illustrate classic examples of common entities with clinical photographs, radiographic imaging, intraoperative photographs, gross pathology images, cytology, classic histology, and any pertinent supporting studies (histochemical, immunohistochemical, immunofluorescence, molecular, genetic and/or ultrastructural). The text includes a brief summary of clinical and histopathologic findings and potential differential diagnostic considerations clinically or pathologically. On occasion, we may accept a classic presentation of a very rare entity if these criteria are fulfilled.

The text should be approximately 250-500 words, appropriate legends for the figures shown and 3-5 pertinent references.

Meeting Report

The proceedings of the North American Society of Head and Neck Pathology (part of the United States and Canadian Academy of Pathology) annual meeting are published annually in the spring issue of the journal. These invited manuscripts must be submitted under the Meeting Report article type. The manuscript requires text to include an abstract of no more than 250 words, an introduction, discussion, and conclusion followed by tables, references, and figure legends. Up to 8 color illustrations may be included and no more than 30 pertinent and current references. Submission guidelines for images and tables are as noted below.

Instructions for complying with Ethical Standards

Please replace the first sentence with: Please include a separate section called “Compliance with Ethical Standards” within your manuscript.

Please always include each type of statement as well as the exact statement order and wording as described below for the five disclosure statements. Please always add all five statements, even if one or more are not applicable.

1. Funding (must be included): “This study was funded by X (grant number X)”

In this paragraph all sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

If not applicable, please add the following sentence:

“This study was not supported by any funding.”

2. Conflict of Interest (must be included): “Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.”

If not applicable, please add the following sentence:

“The authors declare that they have no conflict of interest.”

In this paragraph all financial and non-financial competing interests must be declared in this section. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

3. Ethical approval (must be included):

- For studies involving patients, please add the following sentence:

“All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

- For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

- For studies with animals, the following statement should be included in the text: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

- If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

A statement on the Institutional Review Board (IRB) approval of your study must be also included in this section.

4. Informed consent (must be included): “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

For all research involving human subjects, informed consent to participate in the study should be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16).

If not applicable, please add one of the following sentences:

“For this type of study informed consent is not required.”

“This study has obtained IRB approval from (indicate the relevant board) and the need for informed consent was waived.”

5. Consent for publication (must be included): “Consent for publication was obtained for every individual person’s data included in the study.”

If your manuscript contains any individual person’s data in any form, consent to publish must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent to publish.

If not applicable, please add the following sentence:

“For this type of study consent for publication is not required.”

Editorial procedure

Peer Review Policy

Peer review is the system used to assess the quality of a manuscript before it is published. Independent researchers in the relevant research area assess submitted manuscripts for originality, validity and significance to help Editors determine whether the manuscript should be published in their journal.

Head and Neck Pathology operates a single-blind peer-review system, where the reviewers are aware of the names and affiliations of the authors, but the reviewer reports provided to authors are anonymous. The benefit of single-blind peer review is that it is the traditional model of peer review that many reviewers are comfortable with, and it facilitates a dispassionate critique of a manuscript.

Submitted manuscripts will generally be reviewed by two to three experts who will be asked to evaluate whether the manuscript is scientifically sound and coherent, whether it duplicates already published work, and whether or not the manuscript is sufficiently clear for publication. Reviewers will also be asked to indicate how interesting and significant the research is. The Editors will reach a decision based on these reports and, where necessary, they will consult with members of the Editorial Board. Where an Editor is on the author list or has any other competing interest regarding a specific manuscript, another member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review.

Any commissioned content, or any content included in special issues/collections, undergoes the same peer review process as a standard submission. The papers will be assessed by the journal's editorial team and at least 2 external peer reviewers. If a Guest Editor is leading the special issue/collection they will be required to have at least 2 independent peer reviewers assess each submission and the final decision will remain with the Editors-in-Chief.

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

The following materials are required to be included with the online submission, or the manuscript will be rejected and returned to the author:

- Cover letter that describes the significance and novelty of the work and includes the statements “All authors have read and approved the manuscript” and “This manuscript is not under consideration elsewhere,” as well as any additional information that may impact the review process.
- Corresponding author’s complete contact information to include address, phone number, and e-mail address.
- Structured Abstract of no more than 350 words (for Original, Review, Meetings Proceedings and Sine Qua Non articles).
- Original Papers and Case Reports should have an Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion, with supplementary materials if necessary.
- All Tables submitted at the end of the paper, not embedded within it, listed in order cited in the manuscript.
- The anatomic site(s) best suited for the original article (part of Classifications section).
- Full names and affiliations of all authors, complete with first and middle names or initials, and e-mail addresses for each.
- Two reviewer suggestions that include names and e-mail addresses.
- Indication of whether or not the paper was invited.
- Please refer to the Instructions for Complying with Ethical Standards and the Compliance with Ethical Standards Sections for additional important requirements that must appear after the Title Page.

Stats Declaration

For all submissions, within the Cover Letter authors must include one or the other of the following statements:

Statistical methods employed are performed by an experienced person, with authorship (acknowledgement) on the manuscript, and the contributor(s) specified.

Or

No statistical analysis was performed in the preparation of this manuscript.

Title Page

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

- Total number of each:

1) text pages, including title page, references, and figure legends;

2) tables; and

3) figures.

Large Language Models (LLMs), such as ChatGPT, do not currently satisfy our authorship criteria. Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript.

Abstract

For Original Articles please provide a structured abstract of up to 350 words organized under the following sections:

- Background
- Methods
- Results
- Conclusions

Review articles should include a general abstract (i.e., the above categories are not required) also of no more than 350 words.

Abbreviations, footnotes, and references should not be used in the abstract, with the exception of standard, repetitive abbreviations.

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration, followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature's LaTeX template.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3,7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>. Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al.” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al. (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN.org LTWA.

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file `sn-basic.bst` which is included in the Springer Nature Article Template.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for doublecolumn text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s). Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1