



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

JEFFERSON LUCAS MENDES

IMUNOEXPRESSÃO DE EFRINA-B2 E EPH-B4 EM ADENOMA PLEOMÓRFICO
CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE E CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO
GLANDULARES SALIVARES

CAMPINA GRANDE

2025

JEFFERSON LUCAS MENDES

**IMUNOEXPRESSÃO DE EFRINA-B2 E EPH-B4 EM ADENOMA PLEOMÓRFICO
CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE E CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO
GLANDULARES SALIVARES**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Linha de pesquisa: Estudo das Alterações do Sistema Estomatognático.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez

CAMPINA GRANDE

2025

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão 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.

M538i Mendes, Jefferson Lucas.

Imunoexpressão de efrina-B2 e EPH-B4 em adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico glandulares salivares [manuscrito] / Jefferson Lucas Mendes. - 2025.

101 f. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2025.

"Orientação : Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón Núñez, Departamento de Odontologia - CCBS".

1. Adenoma pleomórfico. 2. Carcinoma mucoepidermoide. 3. Carcinoma adenoide cístico. 4. Efrina-B2. 5. EPH-B4. I. Título

21. ed. CDD 617.6

JEFFERSON LUCAS MENDES

IMUNOEXPRESSÃO DE EFRINA-B2 E EPH-B4 EM ADENOMA PLEOMÓRFICO,
CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE E CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO
GLANDULARES SALIVARES

Dissertação apresentada à
Coordenação do Curso de Mestrado em
Odontologia da Universidade Estadual
da Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Odontologia

Linha de Pesquisa: Estudo das
Alterações do Sistema
Estomatognático.

Aprovada em: 02/06/2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Cassiano Francisco Weege Nonaka** (***.819.324-**), em **01/07/2025 21:44:22** com chave **b2248a6456dd11f0bfba1a7cc27eb1f9**.
- **Bárbara Vanessa de Brito Monteiro** (***.279.244-**), em **02/07/2025 13:45:49** com chave **02261826576411f0a9a71a7cc27eb1f9**.
- **Manuel Antonio Gordón Núñez** (***.663.264-**), em **02/07/2025 15:17:48** com chave **dbf0bd2a577011f097c906adb0a3afce**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 07/07/2025

Código de Autenticação: 7a581a



A Deus, por ser minha luz, meu refúgio e guia em cada etapa desta jornada.

À minha mãe, pelo amor incondicional, pela força, pelo exemplo de coragem e pelas orações silenciosas que sempre me sustentaram.

Ao meu pai, pelo apoio constante e pela confiança que sempre depositou em mim.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a **Deus** por ser meu alento nas indecisões e minha direção quando não sabia qual caminho seguir.*

*Agradeço à minha mãe, **Tânia Araújo**, por ser minha base em todos os momentos. Sua dedicação, paciência e amor foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Mesmo nas fases mais difíceis, encontrei em seu abraço o conforto e a força que me faltavam. Tudo o que sou e conquistei foi com você e por você.*

*Ao meu pai, **Amaro Moureira**, que acreditou e acredita na minha vocação, mesmo quando eu hesitei, sou grato por não deixar que minhas dúvidas falassem mais alto que meu potencial.*

*A **João Paulo Lima** que esteve presente ao meu lado durante todo esse período, celebrando as pequenas conquistas do dia a dia e se doando para que tudo ocorresse da melhor forma. Viver ao seu lado é meu presente diário.*

*Aos meus amigos, **Samuel Genuino** e **Darttanhan Costa**, que me acompanham desde os tempos de escola, agradeço pela amizade leal, pelas conversas que sempre nos fazem rir e pelas afinidades que nos mantêm unidos até hoje. A **Wellington Santos**, minha sincera gratidão pela amizade genuína e pela presença constante em todos os momentos, sempre com palavras certas e apoio verdadeiro.*

*Aos professores da Escola Estadual de Alcântil em que estudei, meu profundo respeito e gratidão por terem despertado em mim o gosto pelo conhecimento mesmo diante de tantos desafios. Em especial, agradeço à professora de biologia **Libania França**, que, com sua paixão pelo ensino e suas palavras de incentivo, foi uma das primeiras a me mostrar que eu poderia trilhar um caminho na área da saúde.*

*Ao **Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Nuñez**, minha sincera gratidão por ser muito mais do que um docente ao longo da minha formação. Desde o primeiro período da graduação, sua postura acolhedora, suas orientações seguras e sua capacidade de ensinar com humanidade e profundidade fizeram dele uma das maiores referências que levo dessa trajetória. Tê-lo como orientador desta dissertação foi uma honra e uma extensão natural do vínculo acadêmico que construímos. Sua dedicação, paciência e confiança no meu trabalho foram fundamentais.*

*Ao **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka** deixo meu sincero agradecimento. Sua dedicação incansável na busca por recursos, sua responsabilidade exemplar na condução das pesquisas e seu bom humor constante criaram um ambiente de trabalho produtivo e acolhedor. Seu comprometimento com a ciência e com os alunos é admirável, e sua presença fez toda a diferença ao longo deste percurso.*

*Agradeço à **Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves**, cuja postura profissional e segurança contribuiu de forma significativa para o meu aprimoramento. Ao **Prof. Dr. João Augusto Viana Goulart-Filho**, que atua no laboratório com simpatia e disposição, sua presença torna o ambiente mais agradável.*

*À **Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, que participou com brilhantismo da minha qualificação e que gentilmente aceitou o convite para integrar a banca da dissertação, agradeço a dedicação ao trabalho e pelas valiosas considerações que certamente contribuirão de forma significativa para o aprimoramento desta pesquisa.*

*Aos demais estimáveis professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB — **Dra. Ana Flávia Granville-Garcia, Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Dra. Daniela Pita de Melo, Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Dra. Jozinete Vieira Pereira, Dra. Andreza Cristina de Lima Targino Massoni, Dr. Alessandro Leite Cavalcanti, Dra. Patrícia Meira Bento, Dra. Alidianne Fábila Cabral Cavalcanti, Dr. Diego Romário da Silva, Dr. Luiz Eduardo Marinho Vieira** — registro minha sincera gratidão pelas valiosas contribuições durante as disciplinas ministradas, pelas oportunidades de aprendizado e pelos constantes incentivos que enriqueceram minha formação.*

*À **Camila Belarmino**, que deu início a este projeto de pesquisa e generosamente compartilhou seu conhecimento em todas as etapas, deixo minha profunda gratidão. À técnica **Denize Nubia Souza**, agradeço pela cooperação constante e pelos momentos de leveza e alegria que tornaram a rotina do laboratório mais acolhedora.*

*Em nome de **Rafaela Augusta**, agradeço com carinho a todos os amigos que fizeram parte da minha graduação, pelos momentos compartilhados, pelo apoio mútuo e pelas memórias que levarei comigo. Aos amigos do laboratório, minha sincera gratidão: **Talytha Rocha, Amanda Gomes, Elton Fernandes, Vanessa Alves e Laís Gonzaga**. Obrigado por cada gesto de parceria, por tantos aprendizados e por construírem um ambiente de trabalho produtivo e feliz.*

*A **Diego Filipe**, que recém-chegado, já se tornou uma presença marcante na minha trajetória. Sua forma de enxergar a pesquisa e de compartilhar saberes ampliou meu olhar acadêmico, e sua amizade genuína tornou-se um presente.*

*À **Natália Araújo**, com seu jeito intenso, agradeço a companhia nos incontáveis cafés e nas conversas e teorias que guardarei comigo sempre.*

*Agradeço ao meu amigo, **Lucas Maynart**, por dividir comigo não só a orientação, mas também os desafios, as incertezas e as conquistas do dia a dia de quem vive a rotina de uma pós-graduação. Sua parceria e bom humor tornaram essa caminhada mais leve e possível.*

*Aos demais colegas da turma do mestrado — **Annyelle Anastácio, Caren Ferreira, Fernanda Araújo, Gabrielli Sales, Ygor Alexandre, Joab Custódio, Luciano Vale, Vitória Marina e Myrelle Leal** — foi um prazer compartilhar essa etapa com cada um de vocês, e espero que possamos continuar nos encontrando em novas experiências e conquistas.*

*À **Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)**, que me deu régua e compasso desde a graduação em Araruna PB. Aos **funcionários do Departamento de Odontologia**, agradeço a atenção e suporte no dia a dia, em especial, à secretária do PPGO-UEPB, **Ahyanna Nóbrega**.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

*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.*

A cada pessoa que, de alguma maneira, colaborou para que esta pesquisa se tornasse possível, expresso minha profunda gratidão.

RESUMO

As neoplasias de glândulas salivares representam um grupo raro e heterogêneo de tumores, com destaque pela sua prevalência, para o adenoma pleomórfico (AP), o carcinoma mucoepidermoide (CME) e o carcinoma adenoide cístico (CAC), cada qual com distintas características histopatológicas e comportamentos biológicos. As efrinas e seus receptores têm sido avaliados e relacionados à etiopatogênese tumoral devido a sua participação na modulação de sinalizações intracelulares bidirecionais associadas a fenômenos celulares e tumorais diversos, conhecimento que é escasso em relação às neoplasias glandulares salivares. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar a imunexpressão das proteínas efrina-B2 e Eph-B4 em amostras de AP, CME e CAC em relação aos seus parâmetros histomorfológicos. Tratou-se de um estudo histomorfológico e imunoistoquímico com anticorpos policlonais anti-Efrina-B2 e anticorpo monoclonal anti-Eph-B4 em 15 AP, 15 CME e 10 CAC de glândulas salivares maiores e menores. Foram estabelecidos percentuais de imunexpressão citoplasmática e nuclear em cinco campos de maior imunorreatividade (400×). Os dados foram analisados por meio dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dwass-Steel- Critchlow-Fligner, e pelo teste de correlação de Spearman, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises demonstraram predomínio da positividade citoplasmática de efrina-B2 em toda a amostra, com variação nos percentuais de expressão entre os tipos tumorais e destaque para os AP. A expressão nuclear mostrou-se ausente na maioria dos casos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tumores ($p = 0,875$), mas observou-se tendência de maior expressão nos grupos de maior agressividade, como os graus II/III no CME ($Md = 30,9$) e os padrões tubular/sólido no CAC ($Md = 60,5$). O Eph-B4 foi citoplasmaticamente expresso em toda a amostra ($p = 0,084$), com percentuais moderadamente maiores nos AP, também se observou tendência de maior expressão nos grupos de maior agressividade, como os graus II/III no CME ($Md = 24,8$) e a expressão nuclear desse receptor foi negativa na maioria da amostra. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as expressões de efrina-B2 e Eph-B4 nos tumores avaliados ($p > 0,05$). Os achados sugerem que o eixo efrina-B2/Eph-B4, principalmente a expressão citoplasmática, pode estar funcionalmente envolvida na modulação de eventos moleculares relacionados à patogénia das neoplasias glandulares salivares avaliadas, especialmente àqueles associados à proliferação e viabilidade celular que garantiriam o crescimento do AP e a eventos relacionados ao comportamento biológico maligno dos CME e CAC.

Palavras chaves: Adenoma pleomórfico; Carcinoma mucoepidermoide; Carcinoma adenoide cístico; Efrina- B2; Eph-B4.

ABSTRACT

Salivary gland neoplasms represent a rare and heterogeneous group of tumors, with pleomorphic adenoma (AP), mucoepidermoid carcinoma (CME), and adenoid cystic carcinoma (CAC) standing out due to their prevalence, each presenting distinct histopathological characteristics and biological behaviors. Ephrins and their receptors have been evaluated and linked to tumor etiopathogenesis due to their role in modulating bidirectional intracellular signaling pathways involved in various cellular and tumoral phenomena—a field still scarcely explored in salivary gland neoplasms. In this context, the present study aimed to analyze the immunoexpression of ephrin-B2 and Eph-B4 proteins in AP, CME, and CAC samples, in relation to their histomorphological parameters. This was a histomorphological and immunohistochemical study employing polyclonal antibodies against ephrin-B2 and a monoclonal antibody against Eph-B4 in 15 AP, 15 CME, and 10 CAC cases from both major and minor salivary glands. Percentages of cytoplasmic and nuclear immunoexpression were assessed in five fields of highest immunoreactivity (400x magnification). Data analysis was performed using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, followed by the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner multiple comparison post hoc test, and Spearman's correlation test, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$). The analyses demonstrated predominant cytoplasmic positivity for ephrin-B2 across the entire sample, with variation in expression levels among tumor types, particularly elevated in AP. Nuclear expression was absent in most cases. Although no statistically significant differences were found between tumor types ($p = 0.875$), a trend toward higher expression was observed in more aggressive groups, such as grade II/III CME (Md = 30.9) and the tubular/solid patterns in CAC (Md = 60.5). Eph-B4 was also cytoplasmically expressed in all samples ($p = 0.084$), with moderately higher levels in AP. A similar trend of increased expression was observed in more aggressive CME cases (Md = 24.8), while nuclear expression of this receptor was negative in the majority of the sample. No statistically significant correlation was found between ephrin-B2 and Eph-B4 expression in the evaluated tumors ($p > 0.05$). The findings suggest that the ephrin-B2/Eph-B4 axis, particularly in its cytoplasmic expression, may be functionally involved in modulating molecular events related to the pathogenesis of the evaluated salivary gland neoplasms—especially those associated with cell proliferation and viability in AP growth and molecular mechanisms underlying the malignant behavior of CME and CAC.

.

Keywords: Pleomorphic adenoma; Mucoepidermoid carcinoma; Adenoid cystic carcinoma; Ephrin-B2; Eph-B4.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Estrutura de Efrinas e receptores Eph	25
Quadro 1 - Elenco de variáveis analisadas no estudo.....	32
Quadro 2 Características histopatológicas para gradação do CME, adaptado de Brandwein <i>et al.</i> (2001).....	34
Quadro 3 Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	35
 Artigo	
Figura 1 - Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de (A) Efrina-B2 e (B) Eph-B4 em AP.....	53
Figura 2 - Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de (C) Efrina-B2 e (D) Eph-B4 em CME.....	54
Figura 3 - Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de (E) Efrina-B2 e (F) Eph-B4 em CAC.....	55
Figura 4 - Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, CME e CAC.....	56
Figura 5 - Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, CME e CAC.....	56
Figura 6 - Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, segundo classificação histomorfológica.....	57
Figura 7 - Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, segundo classificação histomorfológica.....	57
Figura 8 - Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em CME, segundo classificação histomorfológica.....	58

Figura 9 -	Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em CME, segundo classificação histomorfológica.....	58
Figura 10-	Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em CAC, segundo classificação histomorfológica.....	59
Figura 11-	Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em CAC, segundo classificação histomorfológica.....	59
Quadro 1 -	Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	60

LISTA DE TABELAS

		Página
Artigo		
Tabela 1.	Distribuição absoluta e relativa dos casos de adenomas pleomórficos, carcinomas mucoepidermóides e carcinoma adenoide cístico de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.....	60
Tabela 2.	Tamanho da amostra, número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (citoplasma e núcleo) para Efrina-B2 e Eph-B4 em relação aos grupos de lesões.....	61
Tabela 3.	Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para as imunoexpressões citoplasmáticas de Efrina-B2 e Eph-B4.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL:	Do inglês, <i>abl Oncogene</i> , traduzido como Gene abl.
AP:	Adenoma pleomórfico
CAC:	Carcinoma adenoide cístico.
CECP:	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
CEP:	Comitê de ética em pesquisa.
CME:	Carcinoma mucoepidermoide.
CRK:	Do inglês <i>oncogene protein</i> , traduzido como proteína crk de oncogene.
CRTC1:	Do inglês <i>CREB Regulated Transcription Coactivator 1</i> , traduzido como Coativador de Transcrição Regulada por CREB 1.
CXPA:	Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
CRTC3:	Do inglês <i>CREB-Regulated Transcription Coactivator</i> , refere-se Coativador de Transcrição Regulada por CREB 3.
TEM:	Transição epitelial-mesenquimal.
EPH:	Do inglês <i>Erythropoietin-producing hepatocellular</i> , receptores de tirosina quinase.
ETV6:	Do inglês <i>E26 Transformation-specific Variant 6</i> , gene que codifica um fator de transcrição da família ETS.
FAK:	Do inglês <i>focal adhesion kinase</i> , traduzido como quinase de adesão focal.
°GL:	Grau <i>Gay Lussac</i> , representa a porcentagem de álcool puro presente em uma mistura.
HCl:	Ácido clorídrico.
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol.
HMGA2:	Do inglês <i>high mobility group AT-hook 2</i> , traduzido como Grupo AT-hook 2 de alta mobilidade.
IBM:	Do inglês <i>International Business Machines Corporation</i> , traduzido como Corporação Internacional de Máquinas de Negócios.
IHC:	Imunoistoquímica
MAML2:	Do inglês <i>mastermind like transcriptional coactivator 2</i> , traduzido como coativador transcricional semelhante ao mentor 2.
MEC:	Matriz extracelular.

MVD:	Microdensidade vascular.
MYBL1:	Do inglês <i>MYB proto-oncogene like 1</i> , traduzido como proto-oncogene MYB.
MYB:	Do inglês <i>MYB proto-oncogene, transcription fator</i> , traduzido como Proto-oncogene MYB, fator de transcrição.
NFIB:	Do inglês <i>nuclear factor I B</i> , traduzido como Fator Nuclear I B.
NTRK3:	Do inglês <i>neurotrophic receptor tyrosine kinase 3</i> , gene que codifica o receptor de tirosina quinase.
OMS:	Organização Mundial da Saúde.
PD-1:	Do inglês <i>programmed cell death protein 1</i> , traduzido como Proteína de morte celular programada 1.
PDZ:	PSD-95, Dlg1, ZO-1
PLAG1:	Do inglês <i>pleomorphic adenoma gene 1</i> , refere-se ao gene <i>PLAG1</i> .
RET:	Do inglês <i>rearranged during transfection</i> , gene que codifica uma proteína que atua como receptor de tirosina quinase.
RTPCR:	Do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> , traduzido como transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase.
SAM:	Do inglês <i>sterile a motif</i> , traduzido com motivo α estéril
SPSS:	Do inglês <i>statistical package for social sciences</i> , traduzido como programa estatístico para ciências sociais.
TNM:	Tumor-nodo-metástase.
UEPB:	Universidade Estadual da Paraíba.
VEGF:	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
μm:	Micrômetro.

SUMÁRIO

	Página
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....
	17
2	OBJETIVOS.....
	30
2.1	Objetivo geral.....
	30
2.2	Objetivos específicos.....
	30
3	METODOLOGIA.....
	31
3.1	Caracterização do estudo.....
	31
3.2	Aspectos éticos.....
	31
3.3	População.....
	31
3.4	Amostra.....
	31
3.4.1	Crítérios de inclusão e exclusão da amostra.....
	31
3.5	Variáveis.....
	32
3.6	Coleta de dados epidemiológicos.....
	33
3.7	Estudo histomorfológico.....
	33
3.8	Estudo imunoistoquímico.....
	34
3.8.1	Método imunoistoquímico.....
	34
3.8.2	Análise imunoistoquímica.....
	36
3.9	Análise estatística.....
	37
4	ARTIGO.....
	38
4.1	Apresentação.....
	38
4.2	Artigo a ser submetido.....
	39
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....
	63
	REFERÊNCIAS.....
	64
	APÊNDICE A - FICHA UTILIZADA PARA COLETA DE DADOS
	CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....
	70
	APÊNDICE B - FICHA PARA COLETA DE DADOS REFERENTE
	À ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA
	71
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
	DA UEPB.....
	72
	ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS AO
	PERIÓDICO <i>HEAD AND NECK PATHOLOGY</i>.....
	76

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As neoplasias de glândulas salivares constituem um grupo raro de lesões na região de cabeça e pescoço. A 5ª edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece mais de 20 subtipos malignos e 15 benignos pertencentes a esse grupo de neoplasias (Skálová; Hyrcza; Leivo, 2022). Embora sua patogênese permaneça indefinida, diversos fatores têm sido associados à etiologia dessas lesões, incluindo exposição à radiação ionizante, infecções virais, radiação ultravioleta, além do consumo de álcool e tabaco (Zheng *et al.*, 2022).

Esses tumores podem originar-se nas três glândulas salivares maiores — parótidas, submandibulares e sublinguais — ou em qualquer uma das milhares de glândulas salivares menores distribuídas por toda a mucosa oral. As glândulas salivares maiores diferem em sua composição histológica: a parótida é composta exclusivamente por ácinos serosos, a submandibular apresenta proporções semelhantes de ácinos serosos e mucosos, mas com predomínio seroso, enquanto a sublingual é predominantemente mucosa (Szydłowski *et al.*, 2024). Entre 50% e 80% das neoplasias glandulares salivares têm origem na glândula parótida, das quais, aproximadamente, 25% são malignas. Nas glândulas submandibulares, sublinguais e menores, contudo, os índices de malignidade são mais elevados, atingindo cerca de 45%, 85% e 75%, respectivamente (Chandrasekaran *et al.*, 2023; Cunha *et al.*, 2023).

Estima-se que essas neoplasias representam aproximadamente 1% de todas as neoplasias humanas e cerca de 0,3% das malignidades em geral (McKenzie *et al.*, 2023; Ibrahim *et al.*, 2020). Na região de cabeça e pescoço a incidência dessas lesões varia entre 1 e 13 casos por 100 mil habitantes, correspondendo a menos de 5% dos tumores da região em adultos e cerca de 8% em populações pediátricas (Zheng *et al.*, 2022; Chandrasekaran *et al.*, 2023). Diversos estudos indicam a maior prevalência dessas neoplasias em indivíduos do sexo feminino, com taxas variando entre 54% e 65% (Silva *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2025). Pesquisas, como a conduzida por Cunha *et al.* (2023), apresentam uma distribuição equitativa entre os sexos, com proporção aproximada de 1:1, sugerindo ausência de predileção significativa.

Do ponto de vista clínico e histopatológico, essas neoplasias apresentam grande heterogeneidade, o que pode dificultar tanto o diagnóstico quanto a definição do prognóstico. Clinicamente, as manifestações variam de nódulos assintomáticos a lesões dolorosas, podendo

envolver alterações funcionais, como disfagia, além de sintomas neurológicos nos casos com invasão perineural (Szydłowski *et al.*, 2024; Zheng *et al.*, 2022).

Sob o aspecto histopatológico, os tumores de glândulas salivares compreendem uma ampla diversidade de subtipos, incluindo lesões benignas, como o adenoma pleomórfico (AP), e malignas, como o carcinoma mucoepidermoide (CME) e o carcinoma adenoide cístico (CAC), cada qual com padrões distintos de crescimento e diferenciação celular (Brandwein *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2013). A aplicação de marcadores genéticos como *PLG1*, *HER2*, *p63* e *p40* tem contribuído para a caracterização molecular e a compreensão do comportamento biológico desses tumores, permitindo abordagens diagnósticas e terapêuticas mais precisas (Abdelhamid *et al.*, 2022).

O AP, também denominado tumor misto benigno de glândula salivar, representa a neoplasia benigna mais comum das glândulas salivares, correspondendo a aproximadamente 60% dos tumores glandulares salivares em adultos e a 80% em crianças (Zoccali *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2025). Embora seja mais frequentemente localizado na glândula parótida, o AP também pode ocorrer em outras glândulas salivares, como as submandibulares e as glândulas salivares menores (Abdelhamid *et al.*, 2022).

A etiopatogenia do AP envolve uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Dentre esses, destaca-se a exposição prévia à radioterapia, além de alterações genômicas observadas em aproximadamente 70% dos casos, como as fusões gênicas envolvendo *PLG1* (8q12) e *HMG2* (12q14-15) (Toper; Sarioglu, 2021). Há ainda relatos na literatura quanto ao potencial de transformação maligna do AP em carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXPA) (Khanal, 2019; Baskaradass; Upreti, 2023).

O AP apresenta maior incidência em mulheres, com uma razão homem-mulher de aproximadamente 8:13, sendo mais frequentemente diagnosticado entre a quarta e sexta décadas de vida, com idade média de 44 anos. A taxa de incidência anual estimada é de 2 a 3 casos por 100.000 habitantes (Almeslet *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2025).

Clinicamente, manifesta-se como uma massa indolor, de crescimento lento, bem delimitada e encapsulada, com consistência firme ou borrachoide. Em geral, apresenta-se como uma lesão não infiltrativa (Abdelhamid *et al.*, 2022).

Do ponto de vista histopatológico, o AP é caracterizado por um arranjo misto de células epiteliais e mioepiteliais dispostas em estroma de composição variável, incluindo áreas condroides, ósseas, mixoides e condromixoides (Yousra; Saliha, 2021). A estrutura tumoral pode apresentar-se predominantemente sólida, com regiões de diferenciação estromal que

conferem ao tumor sua clássica aparência pleomórfica. A presença de cápsula fibrosa bem definida é um aspecto relevante para o diagnóstico e manejo clínico, visto que contribui para um melhor prognóstico (Speight; Barrett, 2020).

A classificação histopatológica proposta por Seifert *et al.* (1976) divide o AP em quatro subtipos principais: tipo I (clássico), com estroma representando 30% a 50% da lesão; tipo II (estromal), com mais de 80% do tumor composto por estroma; tipo III (neoplásico), com predomínio de células neoplásicas em cerca de 70% da amostra; e tipo IV (monomórfico), composto por células uniformemente distribuídas, altamente celularizadas. Embora útil, essa classificação é considerada subjetiva, podendo resultar em variabilidade interpretativa e estratificação excessiva de amostras, especialmente em estudos com tamanhos amostrais reduzidos (Viana *et al.*, 2013).

Visando minimizar tais limitações, Viana *et al.* (2013) propuseram uma classificação dicotômica, que agrupa os AP em dois grandes grupos com base no componente estromal: o Grupo A, correspondente aos tipos I e II (ricos em estroma), e o Grupo B, englobando os tipos III e IV (ricos em células ou pobres em estroma). Essa abordagem reduz a subjetividade da classificação de Seifert *et al.* (1976), promove maior uniformidade na análise histopatológica e melhora a robustez estatística em estudos com número limitado de casos.

O CME é uma neoplasia maligna de origem epitelial que acomete as glândulas salivares, sendo considerado o tumor maligno mais prevalente nesse grupo (Cunha *et al.*, 2023). A literatura indica maior incidência em mulheres, com pico etário entre a terceira e a sexta décadas de vida. As localizações mais comuns incluem, em ordem decrescente de frequência, a glândula parótida, o palato, a região retromolar e a mucosa jugal (Gill *et al.*, 2018).

Embora a origem do CME ainda não esteja completamente elucidada, evidências sugerem que sua etiopatogenia pode estar associada à exposição à radiação ionizante e a alterações genéticas específicas, como a translocação t(11;19)(q14-21;p12-13), resultando na fusão dos genes *CRTC1* e *MAML2* (Chen *et al.*, 2014). Essa alteração está relacionada à biologia tumoral e ao comportamento clínico da neoplasia, sendo particularmente importante na progressão de lesões de baixo grau para formas de alto grau, impactando diretamente o prognóstico (Sama; Jomiya; Guddati, 2022).

Do ponto de vista clínico, o CME pode se manifestar como aumento de volume local, geralmente indolor, em região de glândula salivar, principalmente na parótida. Tumores de baixo grau costumam apresentar crescimento lento e limites bem definidos, ao passo que os de alto grau tendem a ser mais agressivos, com rápido crescimento, infiltração de tecidos

adjacentes e dor associada (Silva *et al.*, 2018). Em estágios mais avançados, pode haver comprometimento funcional da glândula ou paralisia facial, o que torna o diagnóstico clínico desafiador (Devaraju *et al.*, 2014).

Histologicamente, o CME é composto por uma mistura de células epidermóides, mucosas e intermediárias. Estruturas císticas podem ser revestidas por células mucosas, intermediárias ou, em menor proporção, por células epidermóides poligonais, geralmente não ceratinizadas. As células epidermóides são grandes, poligonais e frequentemente apresentam pontes intercelulares. As células intermediárias são menores, com citoplasma eosinofílico, e podem ter morfologia ovalada ou oncocítica. As células mucosas, embora em menor número, são geralmente grandes, com citoplasma claro e núcleos deslocados periféricamente. O estroma é composto por tecido conjuntivo fibroso, podendo conter infiltrado inflamatório linfocitário na periferia, por vezes com centros germinativos, simulando invasão linfonodal (Brandwein *et al.*, 2001; Devaraju *et al.*, 2014; Gill *et al.*, 2018).

A classificação do grau histopatológico do CME é fundamental para estabelecer o prognóstico e orientar a conduta terapêutica. Auclair *et al.* (1992) propuseram critérios baseados na presença de menos de 20% de componente intracístico, invasão neural, necrose, quatro ou mais mitoses por 10 campos de grande aumento e anaplasia. A partir da pontuação desses critérios, os tumores são classificados como de baixo, intermediário ou alto grau.

Tumores de baixo grau apresentam predomínio de estruturas císticas e células mucosas, enquanto os de alto grau caracterizam-se por crescimento sólido, maior proporção de células epidermóides e intermediárias, atipia acentuada, atividade mitótica elevada, além de frequente invasão vascular e perineural e presença de necrose (Devaraju *et al.*, 2014; Gill *et al.*, 2018).

Outra classificação amplamente utilizada é a proposta por Brandwein *et al.* (2001), que avalia critérios como um componente intracístico inferior a 25%, padrão de invasão tumoral caracterizado por pequenas ilhas e cordões, atipia nuclear acentuada, invasões linfática, vascular e óssea, além de mais de quatro mitoses por cada dez campos de grande aumento, disseminação perineural e presença de necrose. Com base na soma dos escores atribuídos a esses critérios, os tumores são classificados em graus I, II e III. As lesões de grau I apresentam espaços císticos bem delimitados, repletos de células mucosas e com mínima atipia. Os tumores de grau II exibem menor quantidade de estruturas císticas, atipia discreta e predomínio de células intermediárias. Por fim, os tumores classificados como grau III apresentam arranjos sólidos compostos por células intermediárias e epidermóides, apresentando pleomorfismo acentuado e elevado índice mitótico.

A aplicação dessas classificações é essencial para o planejamento terapêutico e o estabelecimento do prognóstico. Tumores de baixo grau, geralmente menos agressivos, respondem bem à ressecção cirúrgica isolada. Os de grau intermediário podem demandar abordagem cirúrgica ampliada, enquanto os de alto grau, com maior risco de metástases e recidivas, requerem terapias combinadas, incluindo cirurgia, radioterapia e, em alguns casos, quimioterapia. Além disso, essas classificações orientam o acompanhamento pós-tratamento, ajustando-o de acordo com o risco de recorrência (Peraza *et al.*, 2020; Gill *et al.*, 2018).

O CAC é uma neoplasia maligna rara e de comportamento agressivo, que acomete preferencialmente as glândulas salivares menores, sobretudo na região do palato, embora também possa envolver as glândulas parótida e submandibular. Além do envolvimento glandular salivar, o CAC pode acometer outras glândulas exócrinas, como as lacrimais, e estender-se para estruturas das vias aéreas superiores (Monzón Rodríguez *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2022).

A etiopatogenia do CAC permanece incerta, embora estudos recentes apontem que entre 60% e 90% dos casos apresentam translocações genéticas envolvendo os genes *MYB* e *NFIB*, resultando na formação da fusão gênica *MYB-NFIB* (Ho *et al.*, 2019). Essa fusão ativa uma cascata de eventos celulares que inclui proliferação, progressão do ciclo celular e resistência à apoptose, por meio da superexpressão do gene *MYB* e de seus genes-alvo reguladores. Além disso, interações entre as células tumorais e a matriz extracelular (MEC) no microambiente tumoral contribuem para o comportamento invasivo da lesão, notadamente para a característica infiltração perineural observada nesse subtipo (Sousa *et al.*, 2022).

Clinicamente, o CAC pode se manifestar como uma massa indolor ou como uma úlcera em regiões da cavidade oral, faringe ou laringe. Embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, é mais prevalente em adultos, com discreto predomínio no sexo feminino. Os sintomas variam conforme a localização anatômica, sendo comum a apresentação como nódulo em glândulas salivares menores. Em casos avançados, os pacientes podem relatar dor, parestesia ou alterações respiratórias, especialmente quando o tumor se localiza em áreas da via aérea. A invasão perineural, bastante frequente, pode resultar em paralisia do nervo facial (Cantù, 2021; Castelnuovo; Turri-Zanoni, 2020).

Do ponto de vista histopatológico, o CAC caracteriza-se por um arranjo composto por células epiteliais e mioepiteliais, dispostas em estruturas com padrão adenoide e cístico. São reconhecidos três padrões principais de crescimento: cribriforme, tubular e sólido (Ellis; Auclair, 1996). Dentre esses, o padrão sólido é comumente associado a comportamento

biológico mais agressivo, maior frequência de invasão perineural, maior risco de recidiva local e menor sobrevida dos pacientes (Sousa *et al.*, 2022; Cantù, 2021).

Diversos sistemas de classificação histológica foram desenvolvidos com base na correlação entre os padrões morfológicos predominantes e o comportamento clínico da neoplasia. Entre os mais utilizados encontram-se os propostos por Spiro *et al.* (1974) e Perzin (1978)/Szanto (1984), os quais consideram a proporção de áreas sólidas como um critério prognóstico fundamental. De acordo com Spiro *et al.* (1974), tumores que apresentam até 50% de áreas sólidas podem ser classificados como de alto grau, enquanto que, segundo Perzin e Szanto, esse limite é de 30%. Tal divergência evidencia a ausência de consenso entre os diferentes sistemas de classificação.

Buscando maior objetividade, Van Weert *et al.* (2015) propuseram uma classificação binária, baseada apenas na presença ou ausência de áreas sólidas, independentemente de sua proporção. De acordo com essa abordagem, tumores sem áreas sólidas são classificados como de baixo grau, enquanto aqueles com áreas sólidas são considerados de alto grau. Essa classificação tem sido útil para prever a agressividade da lesão e auxiliar na definição terapêutica.

O manejo do CAC é frequentemente desafiador devido ao seu crescimento insidioso e à proximidade com estruturas anatômicas vitais. A ressecção cirúrgica com margens livres é o tratamento de escolha, porém, em virtude da alta taxa de recidiva local, a radioterapia adjuvante é frequentemente indicada. Em casos de metástase, a quimioterapia pode ser considerada como terapia complementar (Castelnuovo; Turri-Zanoni, 2020).

Logo, os tumores de glândulas salivares apresentam grande heterogeneidade morfológica, o que frequentemente dificulta sua identificação e classificação. Muitos desses tumores compartilham achados histopatológicos semelhantes, tornando o diagnóstico diferencial um desafio clínico e laboratorial. Essa dificuldade é ampliada pela complexidade de suas características clinicopatológicas, que envolvem apresentações clínicas variadas, sintomas inespecíficos e padrões de crescimento heterogêneos. Além disso, essas neoplasias apresentam comportamentos biológicos distintos, abrangendo desde lesões benignas de crescimento lento até formas malignas altamente agressivas. Tais particularidades reforçam a necessidade de uma avaliação diagnóstica cuidadosa e especializada (Tooper; Sarioglu, 2021; Mohammad *et al.*, 2023).

Nesse contexto, evidencia-se a importância da investigação de múltiplos biomarcadores, capazes de auxiliar na definição histológica e na distinção entre as variedades tumorais. O CAC

e o CME de alto grau, por exemplo, são associados a taxas reduzidas de sobrevida a longo prazo após o tratamento cirúrgico, em virtude da elevada incidência de recorrência local e metástases à distância (Egal *et al.*, 2022). Apesar disso, seus alvos terapêuticos permanecem indefinidos, o que destaca a necessidade no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Dado que os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos, compreender os processos etiopatogênicos subjacentes ao desenvolvimento dessas neoplasias torna-se essencial para a identificação de novos alvos terapêuticos (Zhang *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, a imunoterapia oncológica, especialmente por meio do bloqueio dos pontos de controle imunológicos, tem promovido avanços relevantes na prática clínica, modificando substancialmente o panorama do tratamento dos tumores sólidos (Zhang *et al.*, 2022). Em paralelo, estudos têm investigado alterações genéticas específicas associadas a diferentes subtipos de tumores salivares. No CME, destacam-se os rearranjos cromossômicos CRTC1-MAML2 e CRTC3-MAML2. No CAC, fusões *MYB-NFIB* e *MYBL1-NFIB* são observadas com frequência, enquanto no AP e no CXPA, fusões gênicas como *ETV6-NTRK3* e *ETV6-RET*, bem como *PLAG1* e *HMGA2* têm sido descritas. Esses marcadores genéticos não apenas ampliam o conhecimento sobre a patogênese molecular das neoplasias de glândulas salivares, como também contribuem para sua correta classificação e representam potenciais biomarcadores prognósticos e preditivos (Toper; Sarioglu, 2021).

Com o avanço das pesquisas moleculares, cresce o interesse na aplicação de marcadores prognósticos capazes de aprimorar a compreensão do comportamento tumoral, identificar subgrupos de pacientes com perfis específicos e esclarecer aspectos da fisiopatologia dessas doenças (Barroso *et al.*, 2020; Moura *et al.*, 2021).

Barroso *et al.* (2020) investigaram a expressão das proteínas VEGFC e VEGF-D, bem como a densidade e a proliferação endotelial linfática em neoplasias de glândulas salivares, com o objetivo de compreender o papel da linfangiogênese na biologia tumoral dessas lesões. Os autores observaram níveis elevados desses fatores em tumores malignos, sugerindo que a ativação da via VEGF-C/D pode estar associada à agressividade e ao potencial de disseminação linfática dessas neoplasias. Esses achados reforçam a importância da linfangiogênese como um possível marcador prognóstico e alvo terapêutico em tumores salivares.

Paralelamente, Moura *et al.* (2021) analisaram a expressão imunoistoquímica dos marcadores OCT4 e CD44 em neoplasias de glândulas salivares maiores e menores. Os autores observaram positividade variável entre os diferentes tipos tumorais, com destaque para a maior expressão desses marcadores em tumores malignos. Esses achados sugerem que OCT4,

associado à pluripotência celular, e CD44, envolvido na adesão e migração celular, podem estar relacionados ao potencial de agressividade e à manutenção de características de células-tronco nessas neoplasias, configurando-se como potenciais biomarcadores prognósticos.

No estudo conduzido por Pires *et al.* (2023), foi realizada uma análise exploratória da expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas à autofagia em tumores de glândulas salivares, com o objetivo de investigar possíveis correlações entre esses marcadores e o comportamento biológico das neoplasias. Foram avaliadas proteínas como LC3A, LC3B, p62 e ATG7, conhecidas por sua participação nos mecanismos de degradação celular e manutenção da homeostase. Os resultados revelaram padrões distintos de expressão entre tumores benignos e malignos, sugerindo que a regulação da autofagia pode estar envolvida na patogênese e progressão dessas lesões. A investigação desses marcadores contribui para o avanço do conhecimento sobre os aspectos moleculares das neoplasias salivares, além de oferecer potenciais caminhos para a identificação de novos alvos terapêuticos.

Nesse cenário, proteínas da família efrina/Eph, embora já estudadas em outras neoplasias, ainda permanecem pouco exploradas no contexto das neoplasias de glândulas salivares. Estudos indicam que esses ligantes e receptores, envolvidos em processos como proliferação celular, migração, angiogênese e organização tecidual, podem representar alvos promissores para investigações diagnósticas e terapêuticas, ampliando o entendimento biológico dessas lesões e contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias clínicas (Shao *et al.*, 2013; Fukai *et al.*, 2014).

As efrinas são proteínas de superfície celular que atuam como ligantes para os receptores Eph (Erythropoietin-producing human hepatocellular), compondo o sistema de sinalização Eph/efrina, fundamental para a comunicação célula-célula. Esse sistema participa de mecanismos de sinalização bidirecional e está envolvido em diversos processos biológicos, como o desenvolvimento neural, angiogênese e plasticidade sináptica (Groppa *et al.*, 2018; Grandi *et al.*, 2019).

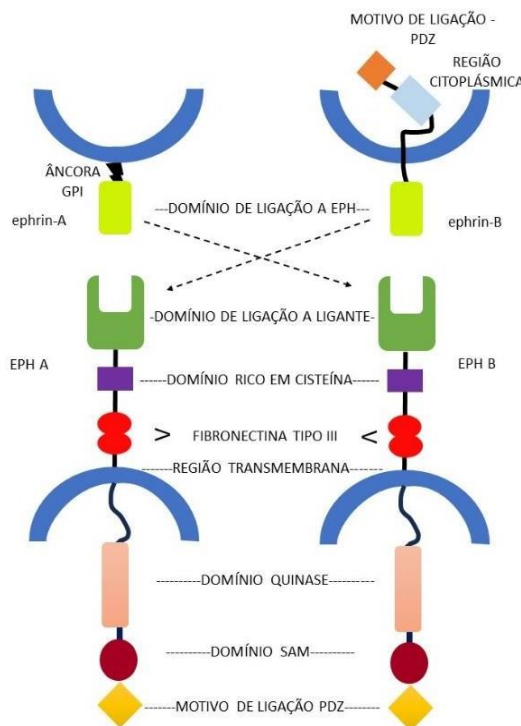
No organismo humano, são conhecidas nove efrinas, classificadas em duas subclasses: Efrinas-A (A1–A5), que se ligam à membrana celular por meio de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), e Efrinas-B (B1–B4), que possuem domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (Pasquale, 2010; LaCombre *et al.*, 2022). Essas diferenças estruturais entre as classes refletem distintas propriedades funcionais. Enquanto as Efrinas-A permanecem ancoradas na membrana por GPI, as Efrinas-B são proteínas transmembranares, contendo um

domínio intracelular do tipo PDZ, que atua na mediação de sinais no interior da célula (Kania; Klein, 2016).

Por sua vez, os receptores Eph formam a maior subfamília de receptores de tirosina quinase ligados à membrana e também são divididos em duas classes: Eph-A (A1–A8, A10) e Eph-B (B1–B4, B6) (Kou; Kandpal, 2018). Estruturalmente, esses receptores possuem regiões extracelulares e intracelulares bem definidas. A porção extracelular, responsável pela interação célula-célula, inclui um domínio de ligação ao ligante, um domínio rico em cisteína e dois domínios de fibronectina tipo III. A porção intracelular compreende um domínio tirosina quinase, um domínio SAM (sterile α motif) e um domínio PDZ, ambos envolvidos na transdução de sinais (Kania; Klein, 2016).

Em termos de especificidade, os receptores Eph-A interagem preferencialmente com os ligantes Efrina-A (A1–A5), enquanto os Eph-B se ligam às Efrinas-B (B1–B3) (Ge *et al.*, 2020). No entanto, algumas interações cruzadas entre subgrupos já foram descritas. Por exemplo, a Efrina-A5, em altas concentrações, pode se ligar ao receptor Eph-B2 (Kou; Kandpal, 2018;), e as Efrinas-B2 e B3 podem interagir com Eph-A4 (Darling; Lamb, 2019). Além disso, diferentes membros das famílias Efrina/Eph podem formar complexos com variados graus de afinidade, refletindo a complexidade e plasticidade funcional desse sistema (Pasquale, 2019) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura de Efrinas e receptores Eph.



Fonte: Adaptada de Xi *et al.*, 2012.

A interação entre efrinas e seus receptores Eph leva à formação de complexos que desencadeiam vias de sinalização intracelular bidirecionais, modulando eventos moleculares tanto na célula que expressa o ligante efrina quanto naquela que expressa o receptor Eph (Pasquale, 2019; Ieguchi; Maru, 2021).

Essa sinalização é altamente regulada e exerce papel essencial em múltiplos processos biológicos. Na chamada sinalização direta, mediada pelos receptores Eph, a ativação ocorre por meio de autofosforilação, fosforilação cruzada por outras tirosinas quinases e interação com proteínas efetoras, desencadeando cascatas intracelulares específicas (Xi *et al.*, 2012). Em contrapartida, a sinalização reversa, acionada pela ativação das efrinas, é mediada por proteínas da família da quinase Src, associando a ativação do ligante a respostas celulares distintas. O equilíbrio entre essas duas vias é essencial para a comunicação célula-célula mediada pelo sistema Eph/Efrina (Pasquale, 2010).

A atuação das proteínas Eph/Efrina tem sido amplamente investigada em tecidos em desenvolvimento, com destaque para os sistemas vascular e nervoso central. Nessas estruturas, essas moléculas regulam a maturação dos vasos sanguíneos, a formação de fronteiras teciduais, a orientação axonal e a migração celular (Arora; Scott, 2023).

Além disso, esse complexo participa de uma variedade de eventos celulares, incluindo a regulação da morfologia, proliferação, sobrevivência e adesão celular. Sua atuação também se estende à resposta inflamatória em situações de lesão tecidual, especialmente pela mediação da adesão celular à matriz extracelular (MEC), o que influencia diretamente a homeostase e a resposta a danos celulares (Kou; Kandpal, 2018; Ieguchi; Maru, 2021).

Por outro lado, alterações na regulação ou expressão aberrante de efrinas, seus receptores ou das vias de sinalização relacionadas têm sido associadas à tumorigênese. Essas disfunções podem favorecer a proliferação celular descontrolada, o aumento da motilidade, a evasão da apoptose e o potencial invasivo em diversos tipos de câncer. Dessa forma, o sistema Eph/Efrina tem ganhado destaque como alvo de pesquisas oncológicas, sendo considerado promissor no desenvolvimento de terapias antineoplásicas, especialmente pelo seu envolvimento na regulação do crescimento tumoral e em processos patológicos associados (Kou; Kandpal, 2018; Liang *et al.*, 2019). Nesse contexto, estudos recentes têm investigado como a modulação dessas moléculas pode contribuir para o controle da progressão tumoral e melhorar os desfechos clínicos (Ieguchi; Maru, 2019; Wu *et al.*, 2023).

Apesar de sua relevância em outros tumores sólidos, a literatura ainda apresenta escassez de estudos sobre o sistema Eph/Efrina em neoplasias de glândulas salivares (PubMed

DataBase, acesso em 27/05/2025). No entanto, algumas pesquisas sugerem que essas proteínas podem participar de eventos etiopatogênicos complexos, como angiogênese, adesão celular, migração, invasão vascular e progressão tumoral em glândulas salivares (Shao *et al.*, 2013; Fukai *et al.*, 2014).

Shao *et al.* (2013) investigaram a expressão de EphA2 e efrina-A1, tanto em nível de mRNA quanto de proteína, em casos de CAC. Utilizando análises de RT-PCR e imunohistoquímica, os autores observaram níveis significativamente elevados desses marcadores em tecidos tumorais quando comparados a glândulas salivares normais. A superexpressão de EphA2 e efrina-A1 foi positivamente correlacionada com a densidade microvascular (MVD) e com características clínicas mais agressivas, como estágio avançado da doença, invasão perineural e presença de metástases. Esses achados sugerem que a via EphA2/Efrina-A1 pode estar envolvida na angiogênese e na progressão tumoral do CAC, representando um potencial biomarcador prognóstico e um possível alvo terapêutico.

Por sua vez, Fukai *et al.* (2014) relataram um caso raro de CAC com extensão intracraniana, localizado na fossa craniana média e região infratemporal, em um paciente de 29 anos. O estudo destacou a presença de disseminação perineural do tumor ao longo do nervo mandibular e investigou a expressão molecular associada a esse comportamento agressivo. A análise imunohistoquímica revelou elevada expressão de EphA2, enquanto efrina-A1 não apresentou marcação significativa. Além disso, as células tumorais exibiram características compatíveis com a transição epitelial-mesenquimal (TEM), sugerindo que a superexpressão de EphA2 pode estar relacionada a um fenótipo tumoral mais invasivo. Esses achados apontam para um possível papel do receptor EphA2 na progressão e metástase do CAC, especialmente em casos com comportamento infiltrativo e difícil controle clínico.

Em relação à efrina-B2, trata-se de uma proteína transmembrana da família das tirosina quinases que exerce papel essencial no desenvolvimento embrionário e na manutenção da morfologia arterial dos vasos sanguíneos ao longo da vida, sendo amplamente reconhecida como um regulador central da angiogênese (Wolf *et al.*, 2022). Sua interação com o receptor Eph-B4, seu parceiro de ligação específico, constitui um eixo funcional fundamental na diferenciação entre vasos arteriais e venosos, sendo este complexo um dos principais determinantes do fenótipo vascular durante o desenvolvimento (Wolf *et al.*, 2019).

No ambiente tumoral, a efrina-B2 está envolvida na promoção da invasão e metástase por meio da mediação de interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), frequentemente reguladas por estímulos como VEGF e hipóxia, que induzem sua

superexpressão em áreas de neovascularização, tanto fisiológica quanto patológica (Okumura *et al.*, 2017).

O receptor Eph-B2 apresenta um papel ambíguo na carcinogênese, podendo atuar como promotor ou supressor tumoral, dependendo do tipo e do microambiente tecidual envolvido. Sua interação ocorre com diversos ligantes da classe B, como as efrinas-B1, B2 e B3 (Wu *et al.*, 2023). Estudos apontam que sua superexpressão está associada a mau prognóstico em tumores como carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Sato *et al.*, 2019), adenocarcinoma pulmonar e tumores gastrointestinais (Zhao *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2022). Em contrapartida, evidências em cânceres colorretal e prostático indicam uma atuação antitumoral do Eph-B2, mediada por sinalizações repulsivas que limitam a expansão celular (Evergren *et al.*, 2018). Esses achados reforçam a complexidade da sinalização bidirecional do sistema Eph/Efrina e a influência do contexto tumoral sobre seus efeitos funcionais (Salgia; Kulkarni; Gill, 2018).

No entanto, é o Eph-B4 o principal receptor de interesse no contexto da sinalização com efrina-B2, estabelecendo uma via altamente específica. Este receptor tirosina quinase transmembrana está envolvido na definição do destino venoso durante o desenvolvimento e permanece expresso nas veias na vida adulta (Yang *et al.*, 2020). A interação específica entre Eph-B4 e efrina-B2, sem afinidade por outros ligantes da mesma subclasse, regula a morfogênese vascular e, em condições de homeostase, controla também a mobilização de células progenitoras hematopoiéticas pela medula óssea (Darling; Lamb, 2019).

No contexto tumoral, a sinalização Eph-B4/Efrina-B2 tem sido associada à evasão da apoptose e à promoção da sobrevivência celular (Salgia; Kulkarni; Gill, 2018). Segundo Ni *et al.* (2020), a ativação de Eph-B4 pode inibir a apoptose mediada por caspase-8, mecanismo potencialmente relevante na progressão do carcinoma espinocelular de esôfago, no qual a expressão dessas proteínas foi correlacionada à tumorigênese e à possibilidade de aplicação como marcadores prognósticos. Brogginini *et al.* (2020) também apontaram que essa interação modula eventos de adesão e repulsão celular, impactando a formação de metástases em tumores como melanoma e neoplasias ósseas, destacando o Eph-B4/Efrina-B2 como um alvo molecular viável para estratégias terapêuticas.

O estudo de Giaginis *et al.* (2016) investigou a expressão das proteínas Eph-B4 e EphB6 em lesões malignas e benignas da tireoide, revelando que ambas estavam significativamente mais expressas em lesões malignas. A expressão aumentada de Eph-B4 foi associada a tumores de maior tamanho, enquanto a de EphB6 correlacionou-se com características de maior agressividade, como metástases linfonodais, invasão capsular, linfática e vascular, além de

maior risco de recorrência. Esses achados sugerem que Eph-B4 e Eph-B6 podem desempenhar papéis importantes na malignização, sendo potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos em neoplasias malignas da glândula.

Estudos recentes também reforçam esse papel na cavidade oral, Abdelazeem *et al.* (2024) demonstraram que a inibição de Eph-B4 em células neoplásicas do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) favorece a metastatização, promovendo a expressão de genes pró-metastáticos. Em contraste, a inibição seletiva da efrina-B2 vascular resultou em aumento da resposta imune antitumoral, sugerindo que a preservação do Eph-B4 na célula tumoral, combinada com a supressão de efrina-B2 no microambiente vascular, pode ser uma abordagem terapêutica eficaz para evitar a progressão metastática. De modo complementar, Al-Jamaei *et al.* (2024) observaram que a superexpressão simultânea de Eph-B4 e efrina-B2 está associada a pior prognóstico e à radiorresistência em tumores de cabeça e pescoço, sugerindo múltiplos mecanismos de escape à terapia.

Dessa forma, a sinalização Efrina-B2/Eph-B4 emerge como um eixo multifuncional, com atuação relevante na regulação de processos celulares fundamentais na tumorigênese, tais como proliferação, migração, invasão, angiogênese e resistência terapêutica. Dada sua relevância biológica e potencial prognóstico, esse sistema tem sido cada vez mais explorado como alvo terapêutico promissor em diferentes tipos de câncer, inclusive nas neoplasias de glândulas salivares, onde seu papel permanece ainda pouco elucidado e requer investigações adicionais (Ieguchi; Maru, 2021). Desta forma, justifica-se a realização da pesquisa visando avaliar a imunoexpressão da efrina-B2 e o receptor Eph-B4 em AP, CME e CAC buscando maiores informações sobre o perfil de expressão dessas proteínas e sua participação nos mecanismos etiopatogênicos dessas neoplasias de glândulas salivares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a imunoexpressão da efrina-B2 e receptor Eph-B4 em relação a parâmetros histomorfológicos de uma série de AP, CME e CAC glandulares salivares.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil clínico (sexo, idade e localização anatômica das lesões) de uma amostra de AP, CME e CAC;
- Caracterizar o perfil de parâmetros histomorfológico da amostra de AP, CME e CAC;
- Determinar os percentuais de células imunopositivas para efrina-B2 e Eph-B4 no componente epitelial neoplásico de AP, CME e CAC;
- Estabelecer correlações entre as imunoexpressões da efrina-B2 e Eph-B4 na amostra de AP, CME e CAC e em relação aos parâmetros histomorfológicos dos tumores.

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização do estudo

O estudo foi realizado por meio de uma pesquisa observacional, de natureza analítica e com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunoexpressões de efrina-B2 e Eph-B4 em relação aos parâmetros histomorfológicos de uma série de casos de AP, CME e CAC glandulares salivares.

3.2 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi registrada na Plataforma Brasil — Base Nacional de Registro de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos — e submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sendo aprovada sob o parecer nº 7.443.947 (Anexo A). O estudo seguiu integralmente as diretrizes éticas estabelecidas pela Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde

3.3 População

A população do estudo foi composta por casos de AP, CME e CAC glandulares salivares diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, no período de 2011 a 2025, além de casos adicionais provenientes do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.4 Amostra

O estudo foi realizado com uma amostra não probabilística de conveniência, constituída por 40 espécimes fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina, correspondendo a 15 casos de AP, 15 casos de CME e 10 casos de CAC.

3.4.1 Critérios inclusão e exclusão

Foram incluídos na amostra os espécimes obtidos por meio de biópsias excisionais ou incisionais de glândulas salivares maiores e menores, desde que apresentassem quantidade adequada de tecido para a realização das análises histomorfológicas e imunoistoquímicas, bem como blocos de parafina preservados em bom estado de conservação. Foram excluídos, especificamente nos grupos CME e CAC, os casos provenientes de pacientes que haviam recebido tratamento antineoplásico prévio, a fim de evitar possíveis interferências nos padrões de imunoexpressão.

3.5 Variáveis

O Quadro 1 exibe o elenco das variáveis independentes e dependentes avaliadas no presente estudo.

Quadro 1 – Elenco de variáveis que foram analisadas no estudo.

VARIÁVEIS DEPENDENTES		
VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO
Efrina-B2	Percentual de células com positividade.	• Células neoplásicas: citoplasma e núcleo
Eph-B4	Percentual de células com positividade.	• Células neoplásicas: citoplasma e núcleo.
VARIÁVEIS INDEPENDENTES		
Tipo de lesão	Tumores glandulares salivares classificados de acordo com as características histomorfológicas	• Adenoma pleomórfico • Carcinoma mucoepidermoide • Carcinoma adenoide cístico
Classificação histomorfológica dos AP de acordo com a quantidade e composição celular e do estroma (Soares <i>et al.</i> , 2009)	Classificação dos AP baseada na composição celular e estromal	• Ricos em células • Pobres em células

Grau de malignidade dos CME	Classificação dos CME em relação aos critérios histomorfológicos de malignidade (Brandwein <i>et al.</i> , 2001)	• Grau I: baixo grau de malignidade • Grau II: intermediário de malignidade • Grau III: alto grau de malignidade
Grau de malignidade dos CAC	Padrões histomorfológicos dos CAC: características do componente epitelial quanto aos arranjos histomorfológicos e aos tipos celulares (Ellis; Auclair, 1996).	• Padrão tubular • Padrão cribriforme • Padrão sólido

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

3.6 Coleta de dados epidemiológicos

O estudo foi baseado nas informações contidas nas fichas de registro e nos laudos de exame histopatológico, a partir dos quais foram obtidas as variáveis analisadas: idade, sexo dos pacientes, localização anatômica e diagnóstico histopatológico das lesões (APÊNDICE A).

3.7 Estudo histomorfológico

A partir do material biológico incluído em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Posteriormente, sob microscopia de luz (*Leica DM 500*, *Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), um patologista sem conhecimento dos dados clínicos relacionados aos casos, realizou a análise histomorfológica dos tumores glandulares salivares segundo a classificação mais recente da OMS (Lépine, 2024).

A análise histomorfológica e classificação dos AP foi realizada de acordo com os critérios de predominância de células neoplásicas ou predomínio de componentes estromais, sendo os casos classificados em: ricos em células (predominância de células epiteliais) e pobres em células (predominância de áreas condroides e mixoides) (Soares *et al.*, 2009).

Com base nos critérios de Brandwein *et al.* (2001), os carcinomas mucoepidermóides (CME) foram classificados em baixo grau (Grau I) quando havia predominância de células mucosas, presença proeminente de células intermediárias e formações císticas, além de padrão de crescimento circunscrito. Foram considerados de grau intermediário (Grau II) aqueles em que as células intermediárias predominavam sobre as mucosas, com a maior parte do tumor apresentando arranjo sólido.

Por fim, os tumores foram classificados como de alto grau de malignidade (Grau III) quando apresentavam predominância de células escamosas, embora células intermediárias e mucosas também estivessem presentes. Essa classificação tem como base as características histomorfológicas detalhadas no Quadro 2.

Quadro 2. Características histomorfológicas para gradação do CME, adaptado de Brandwein *et al.* (2001)

Características	Pontos
Componente intracístico <25%	2
<i>Front</i> de invasão	2
Atipia nuclear	2
Invasão linfática e vascular	3
Invasão óssea	3
>4 mitoses por 10 campos em maior aumento	3
Invasão perineural	3
Necrose	3
Grau I	0
Grau II	2-3
Grau III	4 ou mais

Fonte: Brandwein *et al.* (2001).

Para a classificação dos padrões histológicos dos CAC, foram adotados os critérios propostos por Ellis e Auclair (1996), que consideram três padrões distintos: padrão tubular (áreas tubulares sem componentes sólidos), padrão cribriforme (tumores com arquitetura cribriforme pura ou associada a menos de 30% de áreas sólidas) e padrão sólido (predomínio de áreas sólidas).

3.8 Estudo imunoistoquímico

3.8.1 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-aminopropiltriethoxysilano*, *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 anticorpo policlonal anti-Efrina-B2 e anticorpo monoclonal anti-Eph-B4 (Quadro 3).

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

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Efrina-B2	PA5-106933	Invitrogen	1:400	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 30 min	Overnight
Eph-B4	37-1800	Invitrogen	1:250	Tris, pH 9,0 Steamer, 90°C, 30 min	Overnight

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

O protocolo imunoistoquímico utilizado encontra-se descrito abaixo:

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol aquecido (15 minutos cada);

⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:

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

⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)

⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);

⇒ Recuperação antigênica;

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);

⇒ 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);

- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Efrina B2: Duas passagens em solução de Citrato, pH 6,0 Steamer, 30 min (5 minutos cada);
- ⇒ Eph-B4: ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, 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 (2,5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

3.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada lâmina foi analisada sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), por dois examinadores previamente treinados. As lâminas foram escaneadas em imagens de alta resolução por meio de sistema digital (*MoticEasyScan Pro 6, Motic Inc., Richmond, BC, CAN*) e, posteriormente, visualizadas no programa *DSAssistant* (*Motic Inc., Richmond, BC, CAN*). Um avaliador treinado realizou as análises imunoistoquímicas sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. A análise da expressão das proteínas efrina-B2 e Eph-B4 foi realizada em células neoplásicas, considerando a expressão citoplasmática/membranar e nuclear de cada proteína.

Para as proteínas citadas foram avaliadas, separadamente, a imunexpressão em membrana/citoplasma e em núcleo, adaptando-se a metodologia proposta no estudo de Shao *et al.* (2013), na qual, sob aumento de 100× (*DSAssistant, Motic Inc., Richmond, BC, CAN*), identificou-se 5 campos de maior imunorreatividade em cada caso. Em seguida, esses campos foram capturados sob aumento de 400× (*DSAssistant, Motic Inc., Richmond, BC, CAN*). Com o auxílio do programa *ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)*, as células imunopositivas e negativas foram contadas em cada um dos campos microscópicos capturados. Por fim, estabeleceu-se os percentuais de células imunopositivas em relação ao total de células quantificadas (Apêndice B).

3.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Jamovi Project (versão 2.6.24; Sydney, AU). Para caracterização da amostra, utilizou-se estatística descritiva. Os dados provenientes do estudo imunoistoquímico foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou distribuição não normal. Dessa forma, os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, este último seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner, foram utilizados para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para efrina- B2 e Eph-B4, de acordo com o tipo de lesão e as características histopatológicas dos AP, CME e CAC. Possíveis correlações entre as imunexpressões dessas proteínas, por sua vez, foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman. Devido aos baixos percentuais de imunopositividade para efrina-B2 e Eph-B4 em núcleo, os dados referentes à expressão dessas proteínas foram analisados apenas por meio de estatística descritiva. Para todos os testes estatísticos, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

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 dissertação: **“Imunoexpressão de Efrina-B2 e Eph-B4 em adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico glandulares salivares”**.

O artigo será submetido ao periódico *Head and Neck Pathology* (ISSN: 1936-0568; Fator de impacto: 2,6; Qualis CAPES Odontologia: A1), cujas diretrizes para submissão encontram-se descritas no Anexo B.

4.2 Artigo a ser submetido

IMUNOEXPRESSÃO DE EFRINA-B2 E EPH-B4 EM ADENOMA PLEOMÓRFICO, CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE E CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO GLANDULARES SALIVARES

Título breve: Imunoexpressão de Efrina-B2 e Eph-B4 em neoplasias de glândula salivar

Jefferson Lucas Mendes¹, Camila Maria Belarmino dos Santos¹, Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Manuel Antonio Gordón-Núñez¹.

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

Jefferson Lucas Mendes (<https://orcid.org/0000-0003-0379-4101>), Camila Maria Belarmino dos Santos (<https://orcid.org/0000-0002-5219-6864>) Pollianna Muniz Alves (<https://orcid.org/0000-0003-1297-4032>), Cassiano Francisco Weege Nonaka (<https://orcid.org/0000-0003-2380-109X>), Manuel Antonio Gordón-Núñez (<https://orcid.org/0000-0002-7039-4004>).

Número total de:

- Páginas: 26
- Tabelas: 03
- Figuras: 11
- Quadros: 01.

Autor correspondente:

Manuel Antonio Gordón-Núñez

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: gordonnunez162531@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 neste estudo envolvendo seres humanos seguiram as diretrizes éticas estabelecidas pelo comitê de ética institucional e/ou nacional, em conformidade com a Declaração de Helsinque de 1964 e suas emendas posteriores, ou com normas éticas equivalentes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande, Paraíba, Brasil, sob o parecer nº 7.443.947.

Consentimento informado

Este estudo obteve a aprovação do CEP da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil (Aprovação nº 7.443.947) e a necessidade de consentimento informado foi dispensada.

ABSTRACT

Background: Knowledge is scarce regarding the involvement of ephrins and their receptors in the modulation of cellular and molecular phenomena in the etiopathogenesis of salivary gland neoplasms. This study analyzed the immunoexpression of Ephrin-B2 and Eph-B4 in relation to histomorphological parameters of pleomorphic adenoma (PA), mucoepidermoid carcinoma (MEC) and adenoid cystic adenocarcinoma (ACC).

Methods: The immunoperoxidase method based on the dextran polymer technique and anti-Ephrin-A1 monoclonal antibodies / anti-Ephrin-B2 and anti-Eph-B4 polyclonal antibodies was used, the cytoplasmic and nuclear expression of proteins was analyzed. Percentages of immunopositive cells were established in relation to the total cells quantified in five tumor epithelial fields. The data were statistically analyzed using the Mann-Whitney and Spearman correlation tests ($p < 0.05$).

Results: Cytoplasmic immunoexpression of Ephrin-B2 predominated throughout the sample, with variation in expression percentages among neoplasms, particularly in AP. Nuclear expression was reduced or absent. There were no statistically significant differences among tumors, but a tendency toward greater expression in the most aggressive subtypes, such as grades II/III in MEC and tubular/solid patterns in ACC. Eph-B4 was cytoplasmically expressed throughout the sample, with moderately higher percentages in AP, and nuclear expression of this receptor was negative in most of the sample. There was no statistically significant correlation between the expressions of Ephrin-B2 and Eph-B4 in the three tumor groups evaluated.

Conclusions: The findings suggest that the Ephrin-B2/Eph-B4 axis, mainly the cytoplasmic expression of Ephrin-B2, may be involved in the pathogenesis of the salivary gland neoplasms evaluated, mainly those associated with malignant biological behavior.

Keywords: Pleomorphic adenoma; Mucoepidermoid carcinoma; Adenoid cystic carcinoma; Ephrin-B2; EphB4.

Introdução

Os tumores de glândulas salivares são incomuns, representando cerca de 5% de todas as neoplasias da região de cabeça e pescoço. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece 33 tipos distintos de tumores nessa localização, que apresentam ampla diversidade em relação às características clínicas, composição histológica e comportamento biológico [1,2].

Entre essas neoplasias, o adenoma pleomórfico (AP) destaca-se como o tumor benigno mais prevalente das glândulas salivares [3]. Embora geralmente apresente crescimento lento e encapsulado, seu potencial de recorrência e transformação maligna em carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXPA) torna sua vigilância fundamental [4–5]. O carcinoma mucoepidermoide (CME) é o tumor maligno mais comum nessa região e pode apresentar graus variados de diferenciação histológica, que se correlacionam com o comportamento clínico da lesão [2,6]. Por sua vez, o carcinoma adenoide cístico (CAC), embora menos frequente, é conhecido por sua natureza infiltrativa, curso clínico indolente e elevada taxa de recidiva e metástase tardia, sendo frequentemente associado à invasão perineural [7,8].

Neste contexto, numerosos estudos vêm investigando proteínas reguladoras da homeostase celular e seu envolvimento na patogênese dessas lesões [9–11]. Entre essas, as efrinas e seus receptores Eph vêm ganhando destaque, especialmente em outros tipos de tumores, sendo pouco exploradas nas neoplasias de glândulas salivares [12,13]. As sinalizações promovidas pelo eixo Efrina-B2/Eph-B4 podem regular eventos essenciais como proliferação, migração, invasão e angiogênese. Quando desregulada, essa via pode influenciar diretamente na progressão e agressividade de tumores [14,15].

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a imunoexpressão da efrina-B2 e do receptor Eph-B4 em AP, CME e CAC, com a finalidade de ampliar a compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na etiopatogenia dessas neoplasias de glândulas salivares.

Materiais e métodos

Amostra

A amostra do estudo foi composta por 15 casos de AP, 15 casos de CME e 10 casos de CAC. Os espécimes foram obtidos a partir dos arquivos do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e por meio de casos cedidos pelo Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram incluídos apenas os casos, provenientes

de biópsia excisional ou incisional. que apresentavam material biológico suficiente para a realização das análises histomorfológicas e imunoistoquímicas. Foram excluídos da amostra os casos de CME e CAC com histórico de tratamento antineoplásico prévio à coleta do material biopsiado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UEPB, sob o parecer nº 7.443.947.

Análise morfológica

A partir do material emblocado em parafina, cortes histológicos de 5 µm foram obtidos, em seguida estendidos em lâminas de vidro e corados através da técnica da Hematoxilina e Eosina. Um patologista oral experiente analisou morfolologicamente cada caso, sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*).

A classificação dos AP foi realizada com base nos critérios propostos por Soares *et al.* [17] em tumores ricos em células (com predomínio de células epiteliais) e tumores pobres em células (com predomínio de áreas mixoides e condroides). Para os CME, adotou-se a classificação proposta por Brandwein *et al.* [18] que considera o grau histopatológico de malignidade, categorizando os casos em grau I, II ou III. A classificação dos padrões histológicos dos CAC seguiu os critérios estabelecidos por Ellis e Auclair [19], que distinguem três padrões histomorfológicos: tubular, cribriforme e sólido.

Imunoistoquímica

As amostras selecionadas, fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina, foram submetidas a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro silanizadas.

Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Quadro 1). Para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% e posteriormente incubados com anticorpos primários (Quadro 1), lavados com tampão Citrato (pH 6) ou Tris (pH 9) 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 coloração acastanhada. Por fim, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula. Amostras de granuloma piogênico foram utilizadas como controle positivo para todos os anticorpos. Para

controle negativo, houve a omissão dos anticorpos primários no protocolo anteriormente descrito.

Análise imunoistoquímica

A imunoexpressão de efrina-B2 e Eph-B4 foi avaliada de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Shao *et al.* [13]. Para os anticorpos, considerou-se como positividade a coloração acastanhada de células tumorais, tanto citoplasmática quanto nuclear.

As lâminas foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (*MoticEasyScan Pro 6*, *Motic Inc.*, *Richmond, BC, CAN*) e, subsequentemente, visualizadas no programa *DSAssistant* (*Motic Inc.*, *Richmond, BC, CAN*). Um examinador previamente treinado realizou as análises imunoistoquímicas, sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. Sob aumento de 100× (*DSAssistant*, *Motic Inc.*, *Richmond, BC, CAN*), foram elencadas áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos e sob aumento de 400× (*DSAssistant*, *Motic Inc.*, *Richmond, BC, CAN*), foram fotomicrografados cinco campos nessas áreas de maior imunorreatividade. O programa *ImageJ*® (*Image Processing and Analysis in Java*, *National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*) foi utilizado para a contagem de células imunomarcadas e negativas em cada campo da amostra. Os valores obtidos nos campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de células imunopositivas em AP, CME e CAC em relação ao total de células contadas.

Análise estatística

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Jamovi Project (versão 2.6.24; Sydney, AU). Para caracterização da amostra, utilizou-se estatística descritiva. Os dados provenientes do estudo imunoistoquímico foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou distribuição não normal. Dessa forma, os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, este último seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner, foram utilizados para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para efrina- B2 e Eph-B4, de acordo com o tipo de lesão e as características histopatológicas dos AP, CME e CAC. Possíveis correlações entre as imunoexpressões dessas proteínas, por sua vez, foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Parâmetros clinicopatológicos

A análise dos dados clínicos dos AP indicou predomínio no sexo feminino (n=10; 66,70%), com idades variando de 22 a 76 anos e média de 42 anos. A maioria das lesões (n=14; 93,3%) ocorreu em glândulas salivares menores. Os CME predominaram em mulheres (n=9; 60%), com idades variando de 13 e 83 anos e média de 39,9 anos, principalmente em glândulas salivares menores (n=9; 60%). Os CAC predominaram em mulheres (n=7; 70%), com idades variando de 17 a 86 anos e média de 51,5 anos, com destaque para casos em glândulas salivares maiores (70%) (Tabela 1).

Análise histomorfológica

A análise das características histopatológicas dos AP revelou predominância do subtipo rico em células (n=8; 53,3%). Nos CME, predominou o grau II de malignidade (n = 7; 46,7%). Nos CAC, observou-se predominância do padrão cribriforme (n=5; 50%) (Tabela 1).

Imunoexpressão de Efrina-B2

A tabela 2 exibe os dados da distribuição da imunoexpressão da efrina-B2. A expressão membranar/citoplasmática de efrina-B2 foi observada em toda amostra analisada, com altos percentuais medianos de positividade nos AP ($Md = 39,6$) seguidos pelos CAC ($Md = 29,3$) e CME ($Md = 30,9$) (Fig. 4). A análise da expressão nuclear revelou predominante negatividade na maioria da amostra, com alguns casos isolados, AP (n=4) e CME (n=4) e CAC (n=1) que apresentaram baixos percentuais de imunopositividade (Fig. 5).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de efrina-B2 em membrana/citoplasma entre as lesões analisadas ($p > 0,05$) (Fig. 4). Devido ao reduzido número de casos com positividade nuclear para efrina-B2, não foi possível análise de diferença estatística dessa variável entre os tumores (Fig. 5).

Considerando os parâmetros histomorfológicos dos AP, não foi observada diferença estatisticamente significativa na imunoexpressão membranar/citoplasmática ($p = 0,955$) de efrina-B2, no entanto, observou-se maior mediana de expressão no grupo pobre em células (Fig. 6).

A expressão membranar/citoplasmática de efrina-B2 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grau histopatológico de malignidade dos CME ($p = 0,390$), porém houve maior mediana de positividade citoplasmática nos tumores com graus II/III (Fig. 8).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão membranar/citoplasmática de efrina-B2 entre padrões histopatológicos dos CAC ($p= 1,000$), embora a mediana nesse compartimento celular tenha sido superior nos casos com padrão tubular/sólido (Fig. 10). A imunoexpressão nuclear foi expressamente negativa independente do grau histopatológico (Fig. 11).

Imunoexpressão de Eph-B4

A tabela 2 exhibe os dados da distribuição da imunoexpressão do Eph-B4. A expressão membranar/citoplasmática de Eph-B4 foi observada em toda amostra analisada, com percentuais moderados de positividade nos AP ($Md = 42,9$), seguidos pelos CME ($Md = 24,8$) e CAC ($Md = 8,09$) (Fig. 4). A análise da expressão nuclear evidenciou negatividade na maioria da amostra, com apenas um caso de AP e um de CME que apresentaram baixos percentuais de imunopositividade (Fig. 5).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão membranar/citoplasmática de Eph-B4 entre as lesões analisadas ($p > 0,05$), assim como na expressão nuclear desta proteína (Tabela 2; Fig. 4 e Fig. 5).

Em relação ao subtipo histopatológico dos AP, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão membranar/citoplasmática ($p = 0,536$), embora o subtipo pobre em células tenha apresentado a maior mediana de positividade (Fig. 6).

Não houve diferenças estatisticamente significativas da imunoexpressão membranar/citoplasmática de Eph-B4 entre os graus histopatológicos dos CME ($p = 0,949$), embora os casos de graus II/III tenham apresentado uma mediana superior de positividade (Fig. 8).

Entre os subgrupos histopatológicos dos CAC não houve diferenças estatisticamente significativas na expressão membranar/citoplasmática de Eph-B4 ($p = 0,310$), porém os casos com padrão cribriforme apresentaram uma mediana discretamente superior de positividade (Fig. 10).

Correlações entre as imunoexpressões de Efrina-B2 e Eph-B4

A análise de correlação de Spearman entre as expressões membranar/citoplasmáticas de efrina-B2 e Eph-B4 não demonstrou significância estatística nos três grupos tumorais avaliados.

Discussão

Estudos recentes têm demonstrado a participação das efrinas e Ephs na promoção de proliferação celular, angiogênese, invasão e metástase de diversas neoplasias [14,15, 21]. Entretanto, informações sobre a expressão dessas proteínas e seus receptores em tumores de glândulas salivares ainda são escassas, com destaque para dois estudos que avaliaram efrina-A1 e Eph-A2 em CAC [13,21]. Os achados da presente pesquisa fornecem um perfil da expressão de duas proteínas da família B em três dos principais subtipos tumorais de glândulas salivares.

Estudos iniciais identificaram a expressão de efrina-B2 e seu receptor específico Eph-B4 associada à iniciação e progressão tumoral, sobretudo por seu envolvimento direto na regulação da angiogênese [14,15]. A efrina-B2 é amplamente reconhecida como um marcador arterial e regulador essencial da morfogênese vascular, enquanto o Eph-B4 atua como marcador venoso, sendo ambos fundamentais para o equilíbrio entre proliferação e remodelamento vascular [22]. Evidências apontam que a ativação do eixo Efrina-B2/Eph-B4 contribui para a sobrevivência celular, evasão da apoptose, invasão tumoral e formação de metástases, destacando seu potencial papel na biologia tumoral de neoplasias de origem epitelial e mesenquimal [23]. No presente estudo, observou-se imunoe expressão membranar/citoplasmática de efrina-B2 e Eph-B4 em diferentes intensidades nos três subtipos tumorais analisados (AP, CME e CAC).

De acordo com Kaenel, Mosiman e Andres, [24], a efrina-B2 e o receptor Eph-B4 têm papéis fundamentais na biologia do câncer de mama. A efrina-B2 contribui para a manutenção do nicho de células-tronco mamárias e sua desregulação pode favorecer a tumorigênese e a metástase. O Eph-B4, por sua vez, apresenta função dual: promove o crescimento tumoral nas fases iniciais, mas sua expressão é reduzida em estágios invasivos, atuando também como regulador homeostático. Face ao exposto, os moderados percentuais de expressão membranar/citoplasmática observados em grande parte da amostra avaliada no presente estudo, especialmente nos AP, poderiam corroborar os achados da literatura [24], levando-nos a inferir que a expressão de efrina-B2 e Eph-B4 possa estar funcionalmente relacionada a eventos de sobrevivência celular epitelial neoplásica no AP, contribuindo, assim, para sua etiopatogenia.

Entre os tumores malignos, a efrina-B2 apresentou maior percentual de imunopositividade membranar/citoplasmática nos CAC, enquanto o Eph-B4 mostrou maior expressão membranar/citoplasmática nos casos de CME. A expressão nuclear foi ausente ou muito baixa em toda a amostra, sugerindo que a localização citoplasmática dessas proteínas pode estar relacionada à sua atividade funcional nessas neoplasias. Esses achados sugerem que

efrina-B2 e Eph-B4 podem participar de mecanismos envolvidos na patogênese dos tumores de glândulas salivares, especialmente por meio de sua atuação citoplasmática.

O perfil de imunexpressão membranar/citoplasmática da efrina-B2 observado neste estudo, especialmente nos casos de CAC, apresenta semelhanças com os achados de Shao *et al.* [13], que analisaram a expressão de efrina-A1 e Eph-A2 em CAC. Assim como na pesquisa de Shao *et al.* [13], que identificou alta imunorreatividade membranar e citoplasmática da efrina-A1 associada a maior densidade microvascular ($p < 0,01$) e ao subtipo sólido. Os achados desta pesquisa também evidenciam imunexpressão citoplasmática de efrina-B2 em CAC e com maior mediana para o subtipo sólido. Embora os marcadores avaliados sejam distintos, ambos pertencem à família das efrinas e reforçam o potencial papel desse sistema molecular na biologia tumoral das glândulas salivares, especialmente na angiogênese tumoral.

Em relação à imunexpressão citoplasmática de efrina-B2 nos diferentes subtipos histopatológicos do CME, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os graus de malignidade, foi notada uma tendência a maior expressão em tumores classificados como grau II e III. Esse achado ganha relevância quando considerado em conjunto com os resultados obtidos nos CAC, especialmente nos padrões tubular e sólido – este último reconhecido por seu comportamento mais agressivo –, que também apresentaram medianas mais elevadas de expressão de efrina-B2.

Além disso, nesses subtipos mais agressivos do CAC, observou-se igualmente uma maior expressão do receptor Eph-B4, o que reforça a hipótese de que esse perfil de expressão possa estar relacionado à modulação de eventos moleculares envolvidos no comportamento biológico tumoral. Entre esses eventos, destacam-se a proliferação e a sobrevivência celular neoplásica, sugerindo um possível papel funcional dessas proteínas na agressividade das neoplasias analisadas.

Os achados antes citados estão de acordo com observações descritas por Ni *et al.* [25], os quais discutem a potencial participação do eixo Efrina-B2/Eph-B4 na sobrevivência de células tumorais, por meio da inibição da via apoptótica mediada por caspase-8 e da regulação das interações célula-célula que promovem migração e invasão. De modo semelhante, Al-Jamaei *et al.* [23] sugerem que a superexpressão de efrina-B2 e Eph-B4 pode estar associada a pior prognóstico em tumores de cabeça e pescoço, além de contribuir para a resistência à radioterapia.

Resultados descritos por Noren *et al.* [24], evidenciam a relevância funcional do eixo Eph-B4/efrina-B2 na progressão tumoral, demonstrando que a interação entre Eph-B4,

expresso em células tumorais, e efrina-B2, presente nas células endoteliais, regula diretamente a angiogênese tumoral. Esse mecanismo favorece a formação de novos vasos sanguíneos, essenciais para a nutrição e crescimento tumoral, sugerindo que essa via pode representar um alvo terapêutico promissor. Esses achados reforçam a hipótese de que a expressão de Eph-B4 e efrina-B2 em neoplasias pode estar associada a um comportamento biológico mais agressivo, como também observado nas neoplasias malignas de glândulas salivares avaliadas neste trabalho.

A análise da expressão de Eph-B4 especificamente revelou positividade citoplasmática em todos os grupos tumorais avaliados, sendo mais intensa nos casos de AP, seguida pelo CME e CAC. A expressão nuclear foi rara, restrita a um número reduzido de amostras, fato que não permite fazer inferências sobre o perfil e possíveis papéis dessa proteína no compartimento nuclear celular das neoplasias avaliadas, porém o perfil de expressão nuclear observado poderia sugerir que a presença desse receptor no compartimento nuclear celular neoplásico não exerce papel relevante na patogenia delas. Apesar de não terem sido identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os tumores, a variação observada sugere que a ativação do eixo Efrina-B2/Eph-B4 pode estar relacionada a características biológicas específicas de cada tipo neoplásico.

Nesse contexto, Giaginis *et al.* [14], ao observarem maior expressão membranar/citoplasmática de Eph-B4 em neoplasias da tireoide, especialmente no carcinoma papilífero, destacam a expressão mais acentuada em lesões malignas do que em benignas e que esse perfil era associado a tumores de maior tamanho, reforçando a hipótese de seu envolvimento na progressão tumoral. Face ao exposto, a moderada imunoexpressão de Eph-B4 nas neoplasias de glândulas salivares avaliadas pode refletir sua participação em eventos celulares relacionados à proliferação e viabilidade celulares, contribuindo para o comportamento biológico dessas lesões.

Ieguchi e Maru [22] destacam o eixo Efrina-B2/Eph-B4 como um regulador multifuncional na tumorigênese, atuando em processos como proliferação, angiogênese e resistência a terapias. Nesse contexto, a baixa expressão nuclear, aliada à positividade citoplasmática observadas na amostra deste estudo, poderia reforçar a hipótese que a localização citoplasmática dessas proteínas estaria relacionada à modulação de vias de sinalização específicas, possivelmente implicadas no comportamento biológico dos tumores de glândulas salivares, principalmente nas de comportamento maligno.

Outrossim, considerando a fraca correlação entre a efrina-B2 e Eph-B4 nos AP ($r = 0,236$; $p = 0,398$), moderada associação nos CME ($r = 0,436$; $p = 0,104$) e fraca nos CAC ($r = 0,345$; $p = 0,328$), embora não estatisticamente significativas, sugerem uma tendência de coexpressão entre os dois marcadores, especialmente no CME, indicando que a ativação conjunta desses componentes pode ocorrer em determinados contextos tumorais. Além disso, os achados não descartam a possibilidade que a efrina-B2 possa estar interagindo com algum receptor alternativo diferente do Eph-B4 nos três tipos celulares avaliados.

Apesar dos importantes resultados do presente estudo, ressaltam-se algumas limitações como o tamanho e a estratificação histopatológica da amostra, o que destaca a relevância de novas investigações da relação dessa proteína e seu receptor, seus impactos na patogênese e no comportamento biológico dos tumores glandulares salivares.

Assim, a presente pesquisa contribui de maneira inédita para o entendimento da etiopatogenia dos tumores de glândulas salivares ao explorar a imunoexpressão de efrina-B2 e Eph-B4 em AP, CME e CAC, com destaque para a expressão citoplasmática delas, principalmente da efrina-B2 e sua provável participação em eventos moleculares associados a processos celulares neoplásicos, principalmente, para aqueles inerentes ao comportamento maligno.

Face ao exposto, a presente pesquisa pode alicerçar as bases para que mais estudos sejam propostos, visando elucidar quais seriam os mecanismos moleculares específicos envolvidos na patogenia dessas lesões. Além disso, os achados aqui relatados fornecem subsídios para futuras investigações sobre o papel dessas proteínas como potenciais biomarcadores prognósticos ou alvos terapêuticos em tumores de glândulas salivares.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem uma possível participação das proteínas Efrina-B2 e Eph-B4 na etiopatogenia do AP, CME e CAC glandulares salivares. Apesar da ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tumorais, as maiores medianas de expressão citoplasmática de efrina-B2 e Eph-B4 nos tumores de graus mais elevados do CME e nos padrões mais agressivos do CAC — como o padrão sólido — indicam uma possível associação com o comportamento biológico mais agressivo dessas neoplasias. Esses achados reforçam o potencial envolvimento do eixo Efrina-B2/Eph-B4 nos mecanismos de proliferação, invasão e progressão tumoral em lesões malignas de glândulas salivares.

Referências

1. Skálová A, Hycza MD, Leivo I. Update from the 5th edition of the world health organization classification of head and neck tumors: salivary glands. *Head Neck Pathol.* 2022;16(1):40–53.
2. Cunha JL, Fraga VR, Lima WP, Andrade AO, Gordón-Núñez MA, Nonaka CF, *et al.* Salivary gland tumors: A 13-year clinicopathologic retrospective study in a Brazilian northeast population. *J Clin Exp Dent.* 2023;15(2):e88–95.
3. Abdelhamid AS, Elzayat S, Essa AA, Elsherief H, Amer M. Pleomorphic adenoma of the cheek: a case presentation. *Egypt J Otolaryngol.* 2022;38(1):1–4.
4. Singh K, Agarwal C, Pujani M, Verma P, Chauhan V. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: A diagnostic challenge on cytology. *Diagn Cytopathol.* 2017;45(7):651–4.
5. Khanal P. Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: a case report. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2019;57(215):53.
6. Seifert G, Donath K, Schäfer R. Lipomatous Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland. Classification of Lipomatous Tissue in Salivary Glands. *Pathol Res Pract.* 1976;195(4):247–52.
7. Cantù G. Adenoid cystic carcinoma. An indolent but aggressive tumour. Part A: From aetiopathogenesis to diagnosis. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2021;41(3):206.
8. Castelnovo P, Turri-Zanoni M. Adenoid cystic carcinoma. In: *Anterior Skull Base Tumors.* 2020;84:197–209.
9. Barroso KM, Santos PP, Silva LP, Nonaka CF, Sarmento AS, Pinto LP, *et al.* Analyses of VEGFC/VEGF-D expressions, density and endothelial lymphatic proliferation in salivary gland neoplasms. *Exp Mol Pathol.* 2020;113:104385.
10. Moura JM, Gonzaga AK, Queiroz SI, Martins MD, Pinto LP, Souza LB. Immunohistochemical expression of OCT4 and CD44 in major and minor salivary gland neoplasms. *Braz Oral Res.* 2021;35.
11. Pires EG, Ferreira CR, Cavalcante RB, Aguiar MC, Mesquita RA, Alves PM, *et al.* Immunoexpression of Autophagy-Related Proteins in Salivary Gland Tumors: An Exploratory Study. *Head Neck Pathol.* 2023.
12. Xiao T, Xiao Y, Wang W, Tang YY, Xiao Z, Su M. Targeting EphA2 in cancer. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):1–11.
13. Shao Z, Zhu F, Song K, Zhang H, Liu K, Shang Z. EphA2/ephrinA1 mRNA expression and protein production in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(5):869–78.

14. Giaginis C, *et al.* Clinical significance of EphB4 and EphB6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. *Clin Otolaryngol.* 2015;40(6):772–81.
15. Abdelazeem KNM, *et al.* Manipulating the ephb4-ephrinb2 axis to reduce metastasis in hnscc. *Oncogene.* 2024;1:1–17.
16. Noren NK, Lu M, Freeman AL, Koolpe M, Pasquale EB. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(15):5583–8.
17. Soares AB, *et al.* Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(8):623–9.
18. Brandwein MS, *et al.* Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(7):835–45.
19. Ellis GL, Auclair PL. Atlas of tumor pathology: tumors of the salivary glands. 3rd series, fascicle 17. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.
20. Kou CJ, Kandpal RP. Differential expression patterns of eph receptors and ephrin ligands in human cancers. *Biomed Res Int.* 2018;2018:7390104.
21. Fukai J. Intracranial extension of adenoid cystic carcinoma: potential involvement of epha2 expression and epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis: a case report. *BMC Res Notes.* 2014;7(1):1–6.
22. Ieguchi K, Maru Y. Eph/ephrin signaling in the tumor microenvironment. In: Birbrair A, editor. *Tumor Microenvironment.* Adv Exp Med Biol. 2021;1270:45–7.
23. Al-Jamaei AAH, *et al.* A narrative review of the role of Eph receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2024;30(3):833–45.
24. Kaenel P, Mosimann M, Andres AC. The multifaceted roles of Eph/ephrin signaling in breast cancer. *Cell Adh Migr.* 2012 Mar-Apr;6(2):138-47. doi: 10.4161/cam.20154
25. Ni Q, Chen P, Zhu B, Li J, Xie D, Ma X. Expression levels of ephb4, efnb2 and caspase-8 are associated with clinicopathological features and progression of esophageal squamous cell cancer. *Oncol Lett.* 2020;19(1):917–29.

Fig. 1 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Efrina-B2 (A) e Eph-B4 (B) em AP.

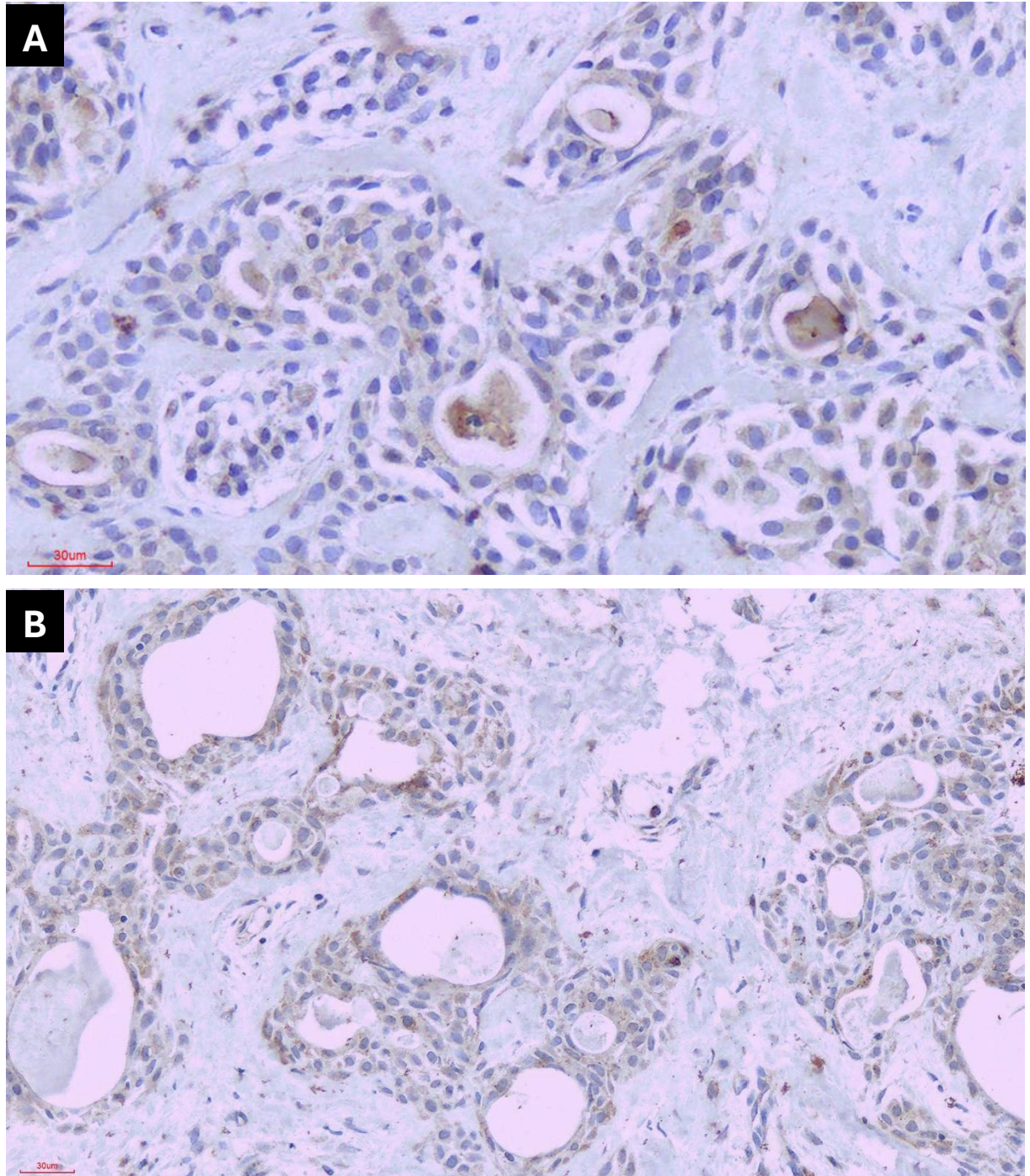


Fig. 2 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Efrina-B2 (C) e Eph-B4 (D) em CME.

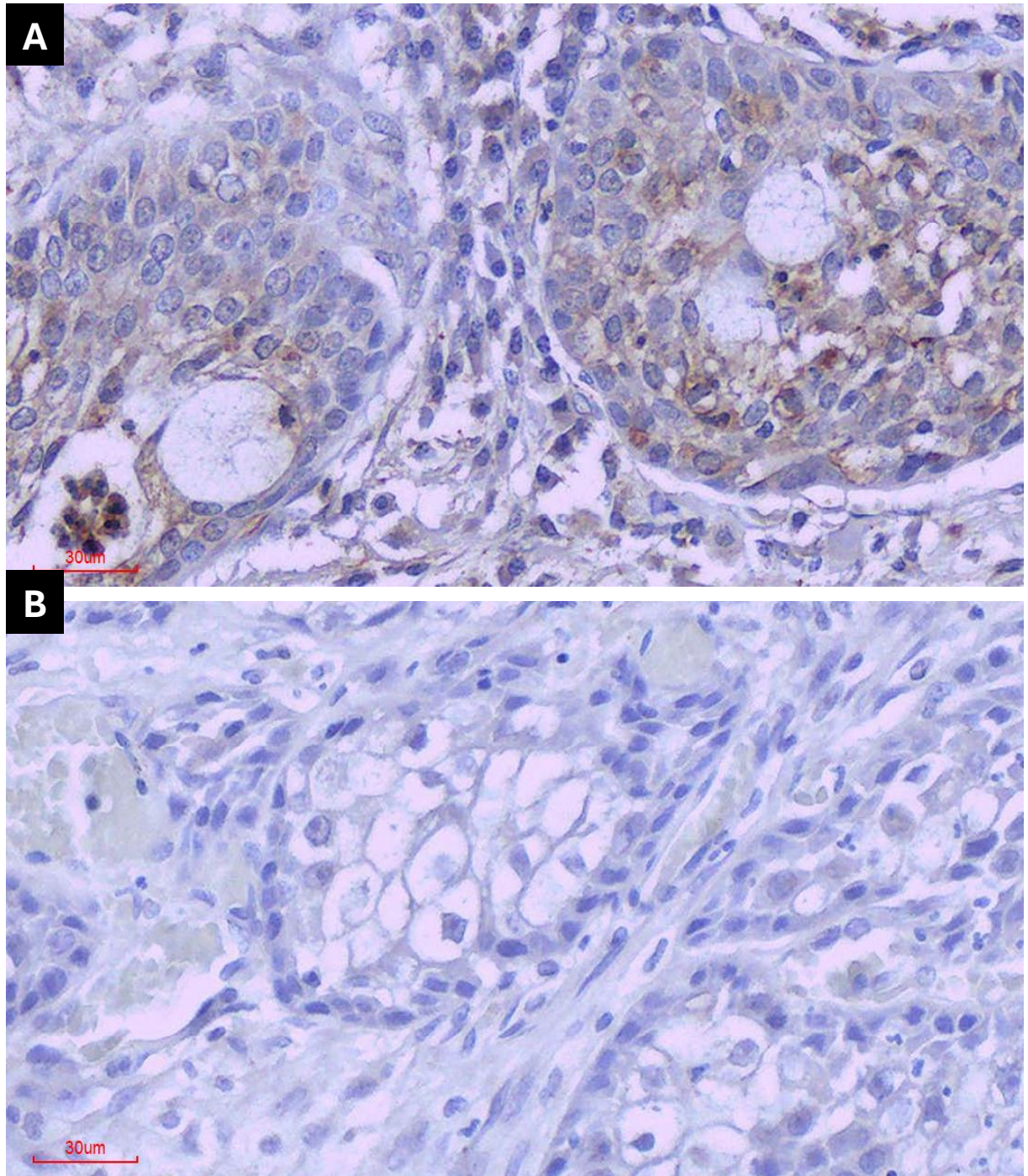


Fig. 3 Imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Efrina-B2 (**E**) e Eph-B4 (**F**) em CAC.

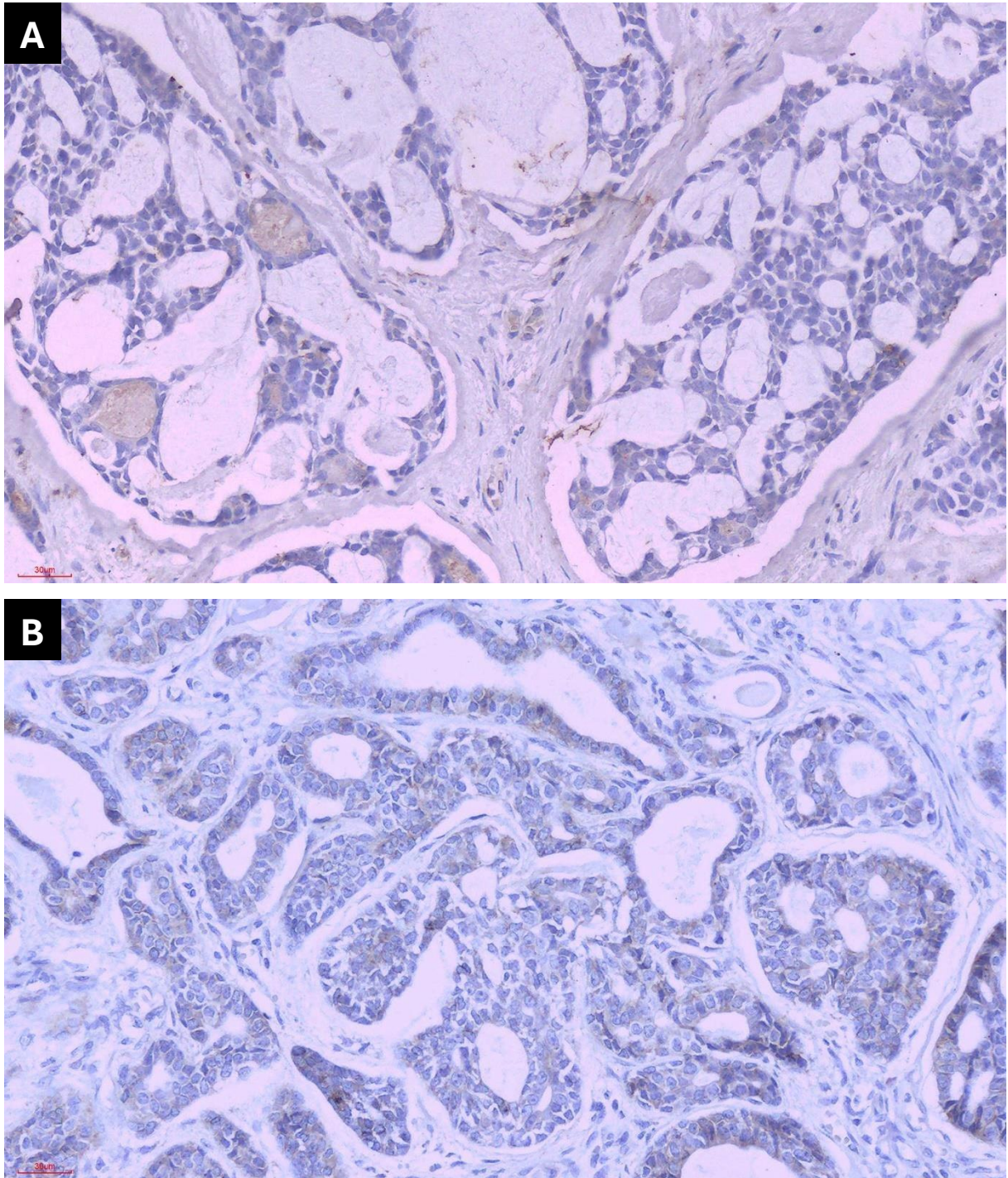


Fig. 4 Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, CME e CAC.

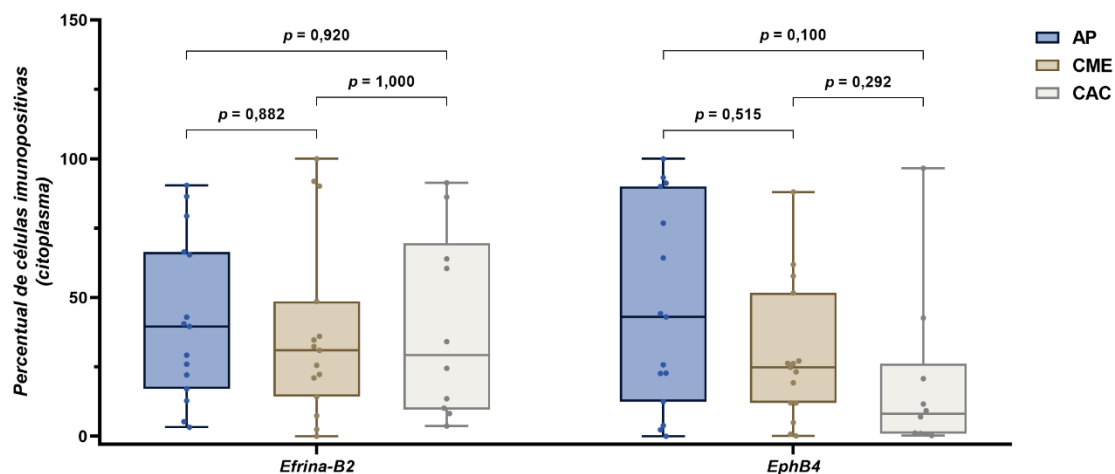


Fig. 5 Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, CME e CAC.

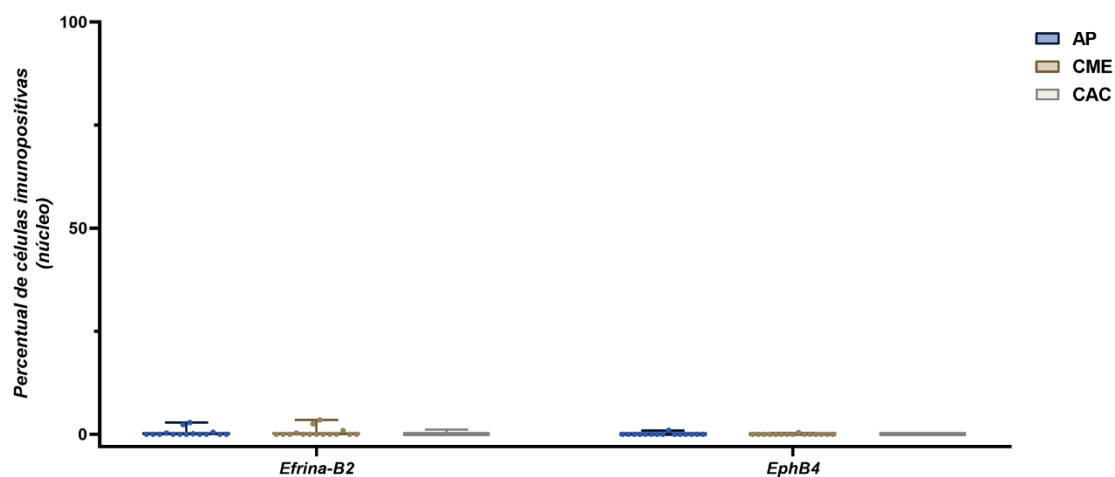


Fig. 6 Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, segundo classificação histomorfológica.

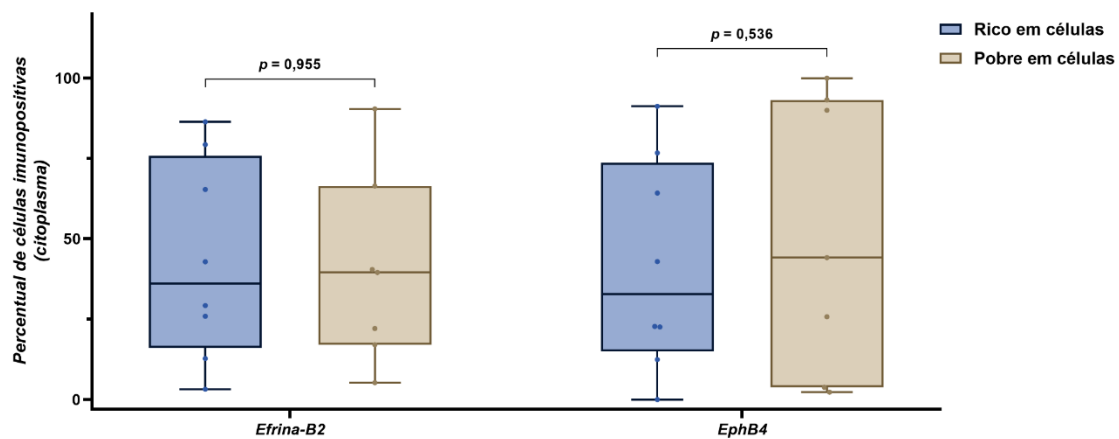


Fig. 7 Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em AP, segundo classificação histomorfológica.

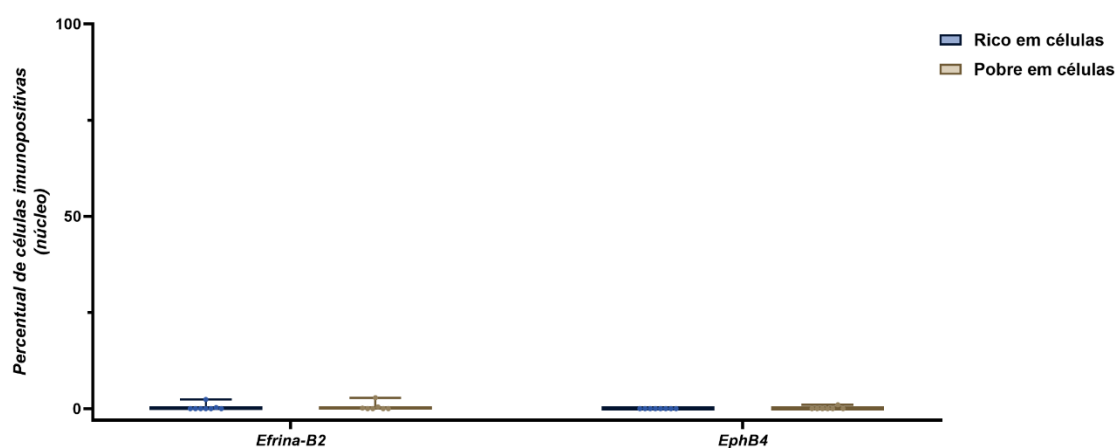


Fig. 8 Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em CME, segundo classificação histomorfológica.

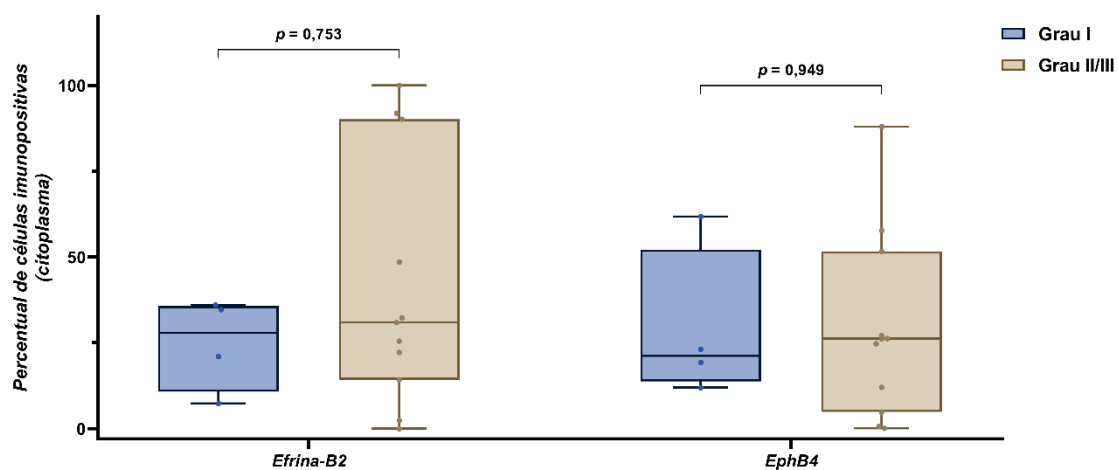


Fig. 9 Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em CME, segundo classificação histomorfológica.

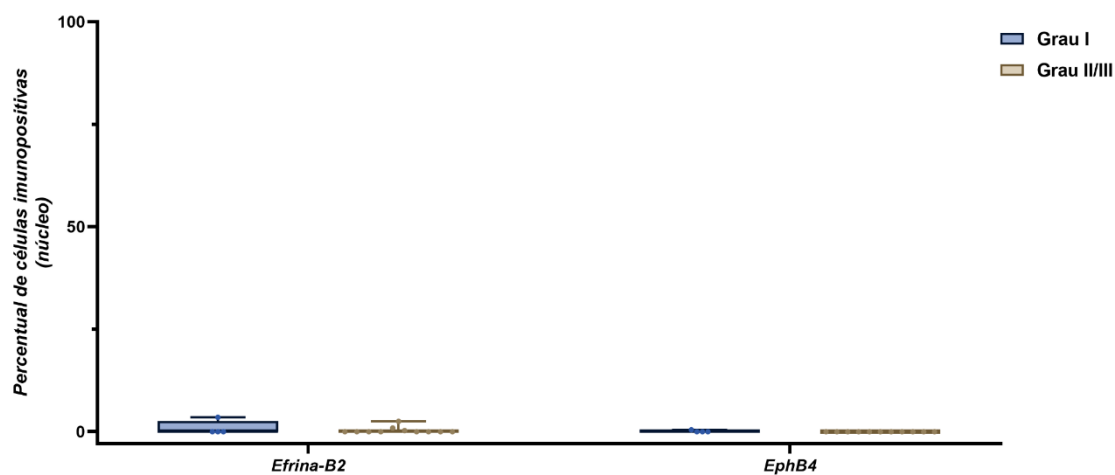


Fig. 10 Box plot ilustrando os percentuais de positividade citoplasmática para Efrina-B2 e Eph-B4 em CAC, segundo classificação histomorfológica.

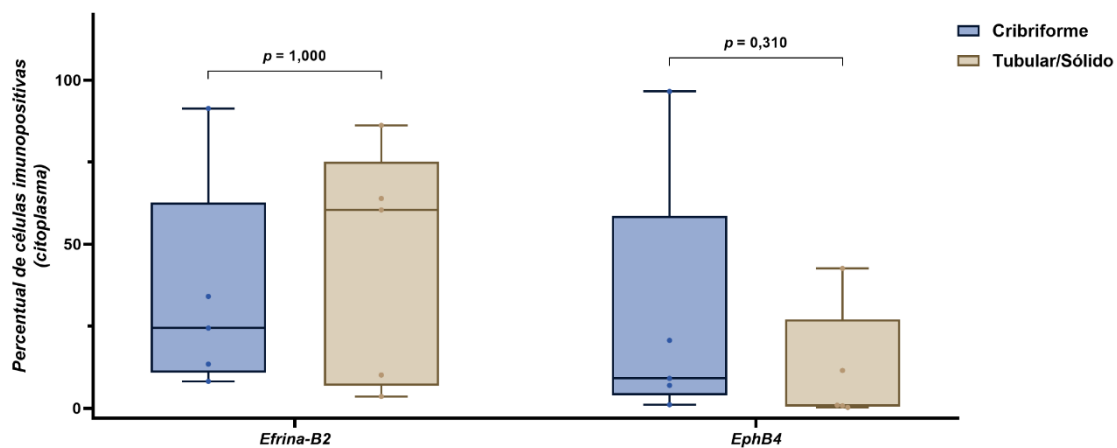
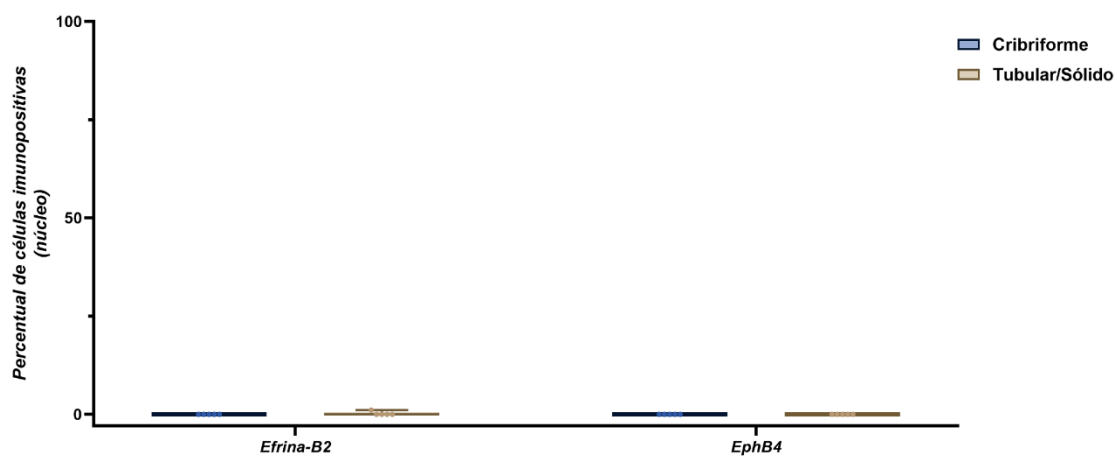


Fig. 11 Box plot ilustrando os percentuais de positividade nuclear para Efrina-B2 e Eph-B4 em CAC, segundo classificação histomorfológica.



Quadros e Tabelas

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

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Efrina-B2	PA5-106933	Invitrogen	1:400	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 30 min	Overnight
Eph-B4	37-1700	Invitrogen	1:250	Tris, pH 9,0 Steamer, 90°C, 30 min	Overnight

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa dos casos de adenomas pleomórficos, carcinomas mucoepidermóides e carcinoma adenoide cístico de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetros Clinicopatológicos			
	AP (n=15)	CME (n=15)	CAC (n=10)
Sexo dos Pacientes			
Feminino	10(66,7%)	9 (60%)	7(70%)
Masculino	5 (33,3%)	6 (40%)	3(30%)
Idade dos pacientes (média em anos) *			
Média	42,0	39,9	51,5
Variação	22-76	13-83	17-86
Desvio Padrão	16,0	21.2	26.2
Localização da Lesão			
Glândula salivar menor	14(93,3%)	9(60%)	3(30%)
Glândula salivar maior	1(6,7%)	6(40%)	7(70%)
Subtipo histopatológico dos AP			
Rico em células	8(53,3%)	N/A	N/A
Pobre em células	7(46,7%)	N/A	N/A
Grau histopatológico dos CME			
Grau I	N/A	4(26,7%)	N/A
Grau II	N/A	7(46,7%)	N/A
Grau III	N/A	4(26,7%)	N/A
Grau histopatológico dos CAC			
Cribriforme	N/A	N/A	5(50%)
Tubular	N/A	N/A	3(30%)
Sólido	N/A	N/A	2(20%)

*Sem dados de idade para um caso

N/A= Não se aplica

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Tabela 2. Tamanho da amostra, número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (citoplasma e núcleo) para Efrina-B2 e Eph-B4 em relação aos grupos de lesões.

	<i>n</i>	<i>Casos positivos (%)</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mediana</i>	<i>DP</i>	<i>Valor p</i>
<i>Efrina-B2</i>							
<i>Citoplasma</i>							
AP	15	15 (100)	3,22	90,4	39,6	29,3	0,875
CME	15	14 (93,3)	0,00	100	30,9	32,3	
CAC	10	10 (100)	3,64	91,3	29,3	33,3	
<i>Núcleo</i>							
AP	15	4 (26,7)	0,00	2,81	0,00	0,90	0,464
CME	15	4 (26,7)	0,00	3,46	0,00	1,06	
CAC	10	1 (10,0)	0,00	1,06	0,00	0,34	
<i>Efrina-B2- AP</i>							
<i>Citoplasma</i>							
Pobre em células	8	8(100)	5,22	90,4	39,9	29,7	0,955
Rico em células	7	7(100)	3,22	86,4	36,0	30,9	
<i>Núcleo</i>							
Pobre em células	8	3(37,5)	0,00	2,81	0,00	1,04	-----
Rico em células	7	1(14,3)	0,00	2,34	0,00	0,81	
<i>Efrina-B2 – CME</i>							
<i>Citoplasma</i>							
Grau I	4	4(100)	7,36	36,0	27,9	13,4	0,753
Grau II/III	11	11(100)	0,00	100	30,9	36,3	
<i>Núcleo</i>							
Grau I	4	1(25,0)	0,00	3,46	0,00	1,73	-----
Grau II/III	11	3(24,3)	0,00	2,51	0,00	0,76	
<i>Efrina-B2 – CAC</i>							
<i>Cistoplasma</i>							
Cribriforme	5	5(100)	8,21	91,3	24,5	33,4	1,000
Tubular/ Sólido	5	5(100)	3,64	86,2	60,5	36,1	
<i>Núcleo</i>							
Cribriforme	5	0(0,00)	0,00	0,00	0,00	0,00	-----
Tubular/ Sólido	5	1(20,0)	0,00	1,06	0,00	0,47	
<i>Eph-B4</i>							
<i>Citoplasma</i>							
AP	15	14 (93,33)	0,00	100	42,90	36,70	0,084
CME	15	15 (100)	0,120	88,00	24,80	25,10	
CAC	10	10 (100)	0,270	96,50	8,09	30,20	
<i>Núcleo</i>							
AP	15	1 (6,70)	0,00	0.950	0,00	0,245	0,710
CME	15	1 (6,70)	0,00	0.410	0,00	0,106	
CAC	10	0 (0,00)	0,00	0.00	0,00	0,00	
<i>Eph-B4 – AP</i>							
<i>Citoplasma</i>							
Pobre em células	8	8(100)	2,28	100	44.2	42,8	0,536
Rico em células	7	7(100)	0,00	91,3	32,8	32,8	
<i>Núcleo</i>							
Pobre em células	8	1(12,5)	0,00	0,950	0,00	0,359	-----
Rico em células	7	0(100)	0,00	0,00	0,00	0,00	

Eph-B4 – CME							
Citoplasma							
Grau I	4	4(100)	12,1	61,8	21,2	22,3	0,949
Grau II/III	11	11(100)	0,12	88,0	26,2	27,1	
Núcleo							
Grau I	4	1(25,0)	0,00	0,41	0,00	0,20	-----
Grau II/III	11	0(0,00)	0,00	0,00	0,00	0,00	
Eph-B4 – CAC							
Citoplasma							
Cribriforme	5	5(100)	1,10	96,5	9,16	39,6	0,310
Tubular/ Sólido	5	5(100)	0,27	42,6	0,96	18,2	
Núcleo							
Cribriforme	5	0(0,00)	0,00	0,00	0,00	0,00	-----
Tubular/ Sólido	5	0(0,00)	0,00	0,00	0,00	0,00	

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Tabela 3. Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) para as imunoexpressões citoplasmáticas de Efrina-B2 e Eph-B4.

CORRELAÇÃO	AP (n= 15)	CME (n= 15)	CAC (n= 10)
Efrina-B2 (citoplasma) x Eph-B4 (citoplasma)	$r= 0.236$ $p= 0.398$	$r= 0.436$ $p= 0.104$	$r= 0.345$ $p= 0.328$

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a literatura ainda seja limitada quanto à investigação da imunoexpressão de efrinas e seus receptores em tecidos glandulares salivares, os achados do presente estudo demonstram que efrina-B2 e seu receptor Eph-B4 apresentam expressão citoplasmática heterogênea nos tumores analisados (AP, CME e CAC), sendo mais pronunciada no AP, especialmente para Eph-B4, sugerindo uma possível participação funcional desse eixo de sinalização na patogênese dessas neoplasias. A variabilidade na intensidade da expressão entre os subtipos tumorais pode refletir diferenças no comportamento biológico e na ativação de vias moleculares associadas à patogenia tumoral.

A expressão nuclear predominantemente reduzida das proteínas analisadas em toda a amostra, parece sugerir que o principal local de atuação delas, no contexto dessas neoplasias, é a membrana/citoplasma. Considerando os parâmetros histomorfológicos, embora não tenham sido identificadas diferenças estatisticamente significativas, os dados descritivos destacaram percentuais de imunopositividade com tendência a maior expressão citoplasmática de efrina-B2 e Eph-B4 nos subtipos de maior agressividade do CME (graus II e III) e do CAC (padrão sólido), o que pode sugerir uma possível correlação biológica com comportamentos clínicos mais agressivos.

No grupo da neoplasia benigna avaliada (AP), observou-se uma leve tendência à maior positividade imunoistoquímica para efrina-B2 e Eph-B4 nos casos classificados como pobres em células. Embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística, tal achado pode refletir um comportamento biológico distinto dentro dos próprios subtipos histológicos do AP. Esse padrão de expressão sugere que, mesmo em lesões benignas, variações nos níveis de efrina-B2 e Eph-B4 podem estar relacionadas a diferenças na atividade celular e em mecanismos associados à proliferação e manutenção da viabilidade celular. Esses dados reforçam a necessidade de investigações adicionais para compreender o papel funcional dessas proteínas na fisiopatologia dos tumores de glândulas salivares.

Desse modo, apesar da ausência de significância estatística limitar interpretações definitivas, os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre a expressão dessas proteínas em tumores de glândulas salivares e reforçam a hipótese de que a sinalização mediada por efrina-B2 e Eph-B4 possa desempenhar papel na patogênese e progressão dessas lesões. Destaca-se, portanto, a importância de estudos futuros com amostras ampliadas e análises funcionais para aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos e validar essas moléculas como potenciais biomarcadores prognósticos ou alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZEEM, K. N. M. *et al.* Manipulating the ephb4-ephrinb2 axis to reduce metastasis in hnscc. **Oncogene**, v. 1, p. 1-17, 2024.
- ABDELHAMID, A. S. Pleomorphic adenoma of the cheek: a case presentation. **The Egyptian Journal of otolaryngology**, v. 38, n. 1, p. 165-169, 2022.
- AL-JAMAEI, A. A. H. *et al.* A narrative review of the role of Eph receptors in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, v. 30, n. 3, p. 833-845, 2024.
- ALMESLET, A. S. Pleomorphic adenoma: a systematic review. **International journal of clinical pediatric dentistry**, v. 13, n. 3, p. 284, 2020.
- ARORA, S.; SCOTT, A. M.; JANES, P. W. Eph Receptors in Cancer. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 315-320, 2023.
- AUCLAIR, P. L.; GOODE, R. K.; ELLIS, G. L. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands evaluation and application of grading criteria in 143 cases. **Cancer**, v. 69, n. 8, p. 2021- 2030, 1992.
- BARROSO K. M. *et al.* Analyses of VEGFC/VEGF-D expressions, density and endothelial lymphatic proliferation in salivary gland neoplasms. **Experimental and Molecular Pathology**, v.113, n. 1, p. 104-125, 2020.
- BASKARADASS, R.; UPRETI, G. Pleomorphic adenoma of submandibular gland in a pediatric case. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery**, v. 75, n. 2, p. 1133-1136, 2023.
- BRANDWEIN, M. S. *et al.* Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *The American journal of surgical pathology*, v. 25, n. 7, p. 835-845, 2001.
- BROGGINI T. *et al.* Ephrin-b2-ephb4 communication mediates tumor-endothelial cell interactions during hematogenous spread to spinal bone in a melanoma metastasis model. **Oncogene**, v. 39, n. 47, p. 7063-7075, 2020.
- CANTÙ, G. Adenoid cystic carcinoma. an indolent but aggressive tumour. part a: from aetiopathogenesis to diagnosis. **Acta otorhinolaryngologica italica**, v. 41, n. 3, p. 206-215, 2021.
- CASTELNUOVO, P.; TURRI-ZANONI, M. Adenoid cystic carcinoma. **Anterior skull base tumors**, v. 84, p. 197-209, 2020.
- CHANDRASEKARAN, A. *et al.* Salivary gland tumours: an epidemiological review of non-neoplastic and neoplastic pathology. **Pathology – Research and Practice**, v. 235, p. e153996, 2023.

- CHEN Z. Aberrantly activated aregegr signaling is required for the growth and survival of crtc1-maml2 fusion-positive mucoepidermoid carcinoma cells. **Oncogene**, v.33, n.29, p.3869–3877, 2014.
- CUNHA, J. L. S. *et al.* Salivary gland tumors: a 13-year clinicopathologic retrospective study in a Brazilian northeast population. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 15, n. 2, p. e88-e95, 2023.
- DARLING, T. K.; LAMB, T. J. Emerging roles for Eph receptors and ephrin ligands in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1473, 2019.
- DEVARAJU, R.; GANTALA R.; AITHA H.; GOTOOR, S. G. Mucoepidermoid carcinoma. **Case Reports**, v.1, p. bcr2013-202776, 2014.
- EGAL, E. S. A. *et al.* Tumor microenvironment in salivary gland carcinomas: An orchestrated state of chaos. **Oral Oncology**, v. 127, p. 105777, 2022.
- ELLIS, G. L.; AUCLAIR, P. L. Atlas of tumor pathology: tumors of the salivary glands. **Third Series**, v. 17, n. 1, p.268, 1996.
- EVERGREN, E.; COBBE, N.; MCMAHON, H. T. Eps15R and clathrin regulate EphB2-mediated cell repulsion. **Traffic**, v.19, n.1, p.44–57, 2018.
- FUKAI, J. Intracranial extension of adenoid cystic carcinoma: potential involvement of epha2 expression and epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis: a case report. **BMC Research Notes**, v.7, n.1, p.1-6, 2014.
- GE, Y. W. The recombinant protein ephb4-fc changes the ti particle-mediated imbalance of opg/rankl via efrinab2/ephb4 signaling pathway and inhibits the release of proinflammatory factors in vivo. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 5, p.1404915, 2020.
- GIAGINIS, C. *et al.* Clinical significance of EphB4 and EphB6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. **Clinical Otolaryngology**, v. 40, n. 6, p. 772–781, 2015.
- GILL, S. *et al.*, Mucoepidermoid carcinoma of hard palate. **Indian journal of pathology and microbiology**, v. 61, n. 3, p. 397, 2018.
- GRANDI, A. Targeting the eph/ephrin system as anti-inflammatory strategy in ibd. **Frontiers in pharmacology**, v.10, p.691-699, 2019.
- GROPPIA, E. Ephrinb2/ephb4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by vegf. **Embo Reports**, v. 19, n. 5, p. e45054, 2018.
- HO, A. S. Genetic hallmarks of recurrent/metastatic adenoid cystic carcinoma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 4276-4289, 2019.

- IBRAHIM, T. R.; AHMED, M. M.; HEGAZY, A. A. Diagnostic utility of immunohistochemical expressions of imp3 versus dog1 and p63 in salivary gland tumors. **Turkish Journal of Pathology**, v.36, n.3, p.227-236, 2020.
- IEGUCHI, K.; MARU, Y. Eph/Ephrin signaling in the tumor microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1270, p. 45-56, 2021.
- ITO, F. A. Salivary gland tumors in a brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 5, p. 533-36, 2005.
- KANIA, A.; KLEIN, R. Mechanisms of ephrin–eph signalling in development, physiology and disease. **Nature Reviews**, v. 17, n. 4, p. 240–256, 2016.
- KHANAL, P. Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: a case report. **JNMA: Journal Of The Nepal Medical Association**, v. 57, n. 215, p. 53, 2019.
- KOU, C. J.; KANDPAL, R. P. Differential expression patterns of eph receptors and ephrin ligands in human cancers. **BioMed Research International**, v. 28, n. 1, p. 7390104, 2018.
- LACOMBE, R.; CECCHINI, A.; SEIBERT, M.; CORNELISON, D. EphA1 receptor tyrosine kinase is localized to the nucleus in rhabdomyosarcoma from multiple species. **Biology Open**, v. 11, n. 10, p. bio059352, 2022.
- LIANG, L. Eph receptor signalling: from catalytic to non-catalytic functions. **Oncogene**, v. 38, n. 39, p. 6567-6584, 2019.
- LIU, W.; YU, C.; LI, J.; FANG, J. The roles of ephb2 in cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, n. 10, p. 788587, 2022.
- LÉPINE, C. Salivary gland tumors: 2022 WHO blue book and beyond. In: **Annales de Pathologie**, v. 24, p. S0242-6498, 2024
- MCKENZIE, J.; LOCKYER, J.; SINGH, T.; NGUYEN, E. Salivary gland tumours: an epidemiological review of non-neoplastic and neoplastic pathology. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 1, n. 1, p. 12-18, 2023.
- MOHAMMAD, D. N. Expression of syndecan-1 and cyclin d1 in salivary gland tumors in relation to clinicopathological parameters. **International Journal of General Medicine**, v. 16, n. 1, p. 823-835, 2023.
- MONZÓN, R. M. *et al.* Carcinoma adenoide quístico. **Revista Cubana de Cirugía**, v. 61, n. 3, p. e1160, 2022.
- MOURA, J. M. *et al* Immunohistochemical expression of OCT4 and CD44 in major and minor salivary gland neoplasms. **Brazilian Oral Research**, v. 16, n. 35, p. e073, 2021.

- NI, Q. *et al.* Expression levels of ephb4, efnb2 and caspase-8 are associated with clinicopathological features and progression of esophageal squamous cell cancer. **Oncology Letters**, v.19, n.1, p.917-929, 2020.
- OKUMURA, F. *et al.* Ubiquitin ligase SPSB4 diminishes cell repulsive responses mediated by EphB2. **Molecular Biology of the Cell**, v.8, n.1, p.3532–3541, 2017.
- PASQUALE, E. B. Eph receptors and ephrins engage in cellular cannibalism. **Journal of Cell Biology**, v. 218, n. 10, p. 3168-3170, 2019.
- PASQUALE, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 165-80, 2010.
- PERAZA, A. Mucoepidermoid carcinoma. an update and review of the literature. **Journal Of Stomatology, oral and maxillofacial surgery**, v. 121, n. 6, p. 713-720, 2020.
- PERZIN, K. H.; GULLANE, P.; CLAIRMONT, A. C. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands:: a correlation of histologic features and clinical course. **Cancer**, v. 42, p. 265-82, 1978.
- PIRES, E. G. *et al.* Immunoexpression of autophagy-related proteins in salivary gland tumors: An exploratory study. **Head and Neck Patholog**, v.17, n.3, p.589-598, 2023.
- RODRIGUES, F. L. S. *et al.* A 14-year retrospective study on clinical and histopathological features of epithelial salivary gland neoplasms. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 66, n. 1, p. 17–24, 2025.
- SALGIA, R.; KULKARNI, P.; GILL, P. S. EphB4: A Promising Target for Upper Aerodigestive Malignancies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1869, n. 2, p. 128-137, 2018.
- SAMA, S.; KOMIYA, T.; GUDDATI, A. K. Advances in the treatment of mucoepidermoid carcinoma. **World Journal Of Oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2022.
- SATO, S. *et al.* EPHB2 carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling. **JCI Insight**, v.4, n.1, p.e132447, 2019.
- SEIFERT, G.; LANGROCK, I.; DONATH, K. A pathological classification of pleomorphic adenoma of the salivary glands (author's transl). *HNO*, v. 24, n. 12, p. 415-426, 1976.
- SHAO, Z. EphA2/ephrinA1 mrna expression and protein production in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. **Journal of Oral And Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 5, p. 869-878, 2013.
- SILVA, L. P. *et al.* Salivary gland tumors in a Brazilian population: A 20-year retrospective and multicentric study of 2292 cases. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 12, p. 2227–2233, 2018.

- SKÁLOVÁ, A.; HYRCZA, M.D.; LEIVO, I. Update from the 5th edition of the world health organization classification of head and neck tumors: salivary glands. **Head and Neck Pathology**, v. 16, n. 1, p. 40-53, 2022.
- SOARES, A. B. *et al.* Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 8, p. 623-629, 2009.
- SOUSA, L. G. Treatment of recurrent or metastatic adenoid cystic carcinoma. **Current Oncology Reports**, v. 24, n. 5, p. 621-631, 2022.
- SPEIGHT, P. M.; BARRETT, A. W. Salivary gland tumours: diagnostic challenges and an update on the latest WHO classification. **Diagnostic Histopathology**, v. 26, n. 4, p. 147–158, 2020.
- SPEIGHT, P. M.; BARRETT, A. W. Salivary gland tumours: diagnostic challenges and an update on the latest WHO classification. **Diagnostic Histopathology**, v. 26, n. 4, p. 147–158, 2020.
- SPIRO R. H.; HUVOS, A.G.; STRONG, E.W. Adenoid cystic carcinoma of salivary origin. a clinicopathologic study of 242 cases. **The American Journal of Surgery**, v. 128, n. 1, p. 512 – 20, 1974.
- SZANTO, P. A. *et al.* Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Cancer**, v. 54, n. 1, p. 1062-1069, 1984.
- SZYDŁOWSKI, K. *et al.* The Impact of Inflammation on the Etiopathogenesis of Benign Salivary Gland Tumors: A Scoping Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12558, 2024.
- TOPER, M. H.; SARIOGLU, S. Molecular pathology of salivary gland neoplasms: diagnostic, prognostic, and predictive perspective. **Advances in Anatomic Pathology**, v.28, n. 2, p. 81-93, 2021.
- VAN WEERT, S. Histopathological grading of adenoid cystic carcinoma of the head and neck: analysis of currently used grading systems and proposal for a simplified grading scheme. **Oral Oncology**, v. 51, n. 1, p. 71-76, 2015.
- VIANA, A. C. M. *et al.* Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a role in the control of apoptosis **Acta Histochemica**, v.115, n.6, p.564-568, 2013.
- WOLF K. G. *et al.* Ephrin-b2-expressing natural killer cells induce angiogenesis. **JVS-Vascular Science**, v.27, n. 3, p. 336-344, 2022.

- WOLF, K.; HU H., ISAJI T., DARDIK A. Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics. **Journal of Vascular Surgery**, v. 69, p. 253–262, 2019.
- WU, Y. *et al.* The functions of epha1 receptor tyrosine kinase in several tumors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 20, p. 2340–2353, 2023.
- XI, H. Q. Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.16, n.12, p.2894-2909, 2012.
- YANG, C. Ephb4 signaling maintains the contractile phenotype of adult venous smooth muscle cells. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 8, p. 4522-4531, 2020.
- YOUSRA, Z.; SALIHA, C. Pleomorphic adenoma of hard palate: a case report. **Pan African Medical Journal**, v. 38, n. 1, p. 146-154, 2021.
- ZHANG, M. J. *et al.* Expression of hhla2, tmigd2, and gitr in salivary gland adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.51, n.4, p. 379-387, 2022.
- ZHAO, C. *et al.* Overexpression of junctional adhesion molecule-A and EphB2 predicts poor survival in lung adenocarcinoma patients. **Tumor Biology**, v. 39, n. 2, p. 1010428317691000, 2017.
- ZHENG, K. J. Changes of the world health organization 2022 classification (5th edition) of salivary glands tumors. **Journal Record: Zhonghua**, v.57, n.11, p.1102-1112, 2022.
- ZOCCALI, F. *et al.* Clinico-histopathological review of 255 patients who underwent parotidectomy for pleomorphic adenoma: a 10-year retrospective study—a proposal for an optimal diagnostic and therapeutic algorithm for patients with recurrent pleomorphic adenoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 280, n. 7, p. 3329-3335, 2023.

APÊNDICE A - FICHA UTILIZADA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS

CASO	IDADE	SEXO	LOCALIZAÇÃO	LESÃO	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

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: IMUNOEXPRESSÃO DE EFRINA-B2, EPH-B2 E EPH-B4 EM ADENOMA PLEOMÓRFICO, CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE E CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO GLANDULARES SALIVARES.

Pesquisador: MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 86944225.0.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 7.443.947

Apresentação do Projeto:

: Estudo transversal com caráter descritivo probabilístico correlacional da análise qualitativa e semiquantitativa da expressão imunoistoquímica efrina-B2, dos receptores de efrinas Eph-B2 e Eph-B4 em relação aos parâmetros histomorfológicos de uma série de AP, CME e CAC glandulares salivares e em tecido glandular salivar normal. A amostra do estudo será constituída por todos os casos de AP, CME e CAC glandulares salivares diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, no período de 2011 a 2025 e casos cedidos pelo Laboratório de Histopatologia Oral da UFMG. Além de amostras de tecido glandular salivar normal.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

Avaliar a imunoexpressão da efrina-B2, dos receptores Eph-B2 e Eph-B4 em relação a parâmetros histomorfológicos de uma série de AP, CME e CAC glandulares salivares. Objetivos específicos:

Analisar o perfil clínico (sexo, idade e localização anatômica das lesões) de uma amostra de AP, CME e CAC;

Caracterizar o perfil histomorfológicos da amostra de AP, CME e CAC;

Endereço: Av. das Baraúnas, 351- Campus Universitário

Bairro: Bodocongó

CEP: 58.109-753

UF: PB

Município: CAMPINA GRANDE

Telefone: (83)3315-3373

Fax: (83)3315-3373

E-mail: cep@setor.uepb.edu.br

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



Continuação do Parecer: 7.443.947

Determinar os percentuais de células imunopositivas para efrina-B2, dos receptores de efrinas Eph-B2 e Eph-B4 no componente epitelial neoplásico e em células do componente estromal de AP, CME, CAC, além de no parênquima e mesênquima de tecido glandular normal;

Estabelecer correlações entre as imunexpressões da efrina-B2, dos receptores de efrinas Eph-B2 e Eph-B4 em relação aos parâmetros histomorfológicos dos AP (Segundo os critérios de Viana et al. 2013), CME (Critérios de Brandwein et al. 2001) e dos CAC (De acordo com os critérios de Van Weert et al. 2015).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por se tratar 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. Neste contexto, deve-se considerar a possibilidade de exposição dos dados pessoais dos pacientes. Este 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, ao contribuir para uma melhor compreensão sobre a importância das efrinas e seus receptores como mediadores em processos patogênicos de lesões neoplásicas de diferentes origens.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta do projeto é relevante academicamente, uma vez que segue uma linha de investigação sobre a compreensão da participação de proteínas nos mecanismos etiopatogênicos de neoplasias de glândulas salivares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: anexada;

Autorização Institucional: Anexada

Termo de Compromisso do Pesquisador Responsável: anexado

Termo de concordância com a pesquisa: anexado

TCLE: justificado a ausência.

Recomendações:

projeto é relevante, apresenta importância acadêmica e social. A metodologia está clara e

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

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



Continuação do Parecer: 7.443.947

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 aprovado 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_BÁSICAS_DO_PROJETO_2508665.pdf	12/03/2025 10:22:10		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_PESQUISA_JEFFERSON.pdf	12/03/2025 10:21:19	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	TERMO_DE_COMPROMISSO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	26/02/2025 15:36:49	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO_AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL_PARA_USO_E_COLETA_DE_DADOS_ARQUIVOS.pdf	26/02/2025 15:32:38	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PEDIDO_DE_DISPENSA_TCLE.pdf	26/02/2025 15:30:42	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_JEFFERSON_CEP.pdf	26/02/2025 15:29:50	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	26/02/2025 15:28:38	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_PESQUISADORES.pdf	26/02/2025 15:28:03	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAO_CONCORDANCIA_PROJETO_PESQUISA.pdf	26/02/2025 15:21:46	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL.pdf	26/02/2025 15:19:52	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	26/02/2025	MANUEL ANTONIO	Aceito

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

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



Continuação do Parecer: 7.443.947

Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	15:13:53	GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
------------	----------------	----------	--------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 16 de Março de 2025

Assinado por:
Patricia Meira Bento
(Coordenador(a))

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

ANEXO B - NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS AO PERIÓDICO *HEAD AND NECK PATHOLOGY*

Instructions for Authors – Head and Neck Pathology

General Information

We only accept manuscript submission via our online manuscript submission system. Please follow the hyperlink “Submit manuscript” on this page and upload all of your manuscript files following the instructions given on screen.

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](http://www.ithenticate.com/resources/papers/ethics-of-self-plagiarism#) 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 seven statements, even if one or more are not applicable; if any are not relevant to the content please state that this declaration is “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. Consent to Participate (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.”

6. Availability of data and materials (must be included):

This statement should explain how to access data supporting the results and analysis in the article, including links/citations to publicly archived datasets analysed or generated during the study.

If it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, this statement should describe how data can be accessed and any conditions for reuse.

When creating a data availability statement, authors are encouraged to consider the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article.

7. Code Availability (must be included):

If any software application or custom code has been used in the preparation of your article, please describe this here.

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.

Submitting Declarations

Please note that Author Contribution information and Competing Interest information must be provided at submission interface. Only the information submitted via the interface will be used in the final published version. Please make sure that if you are an editorial board member and also a listed author that you also declare this information in the Competing Interest section of the interface.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information on these statements as well as possible other mandatory statements.

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

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.

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

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

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.

Important information regarding Abstract

For Research articles and Reviews, please provide a structured abstract of up to 350 words organized under the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusion

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

Additional information regarding the Title Page

The title page should also contain the following information:

- Total number of each:
 1. text pages, including title page, references, and figure legends;
 2. tables; and
 3. figures.

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](http://www.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.

Line Art

- 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 double-column 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

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

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

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Generative AI Images

Please check [Springer’s policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

After Acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Shortly after this you will receive two e-mails. One contains a request to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article, as well as to arrange rights and payment of any associated publication cost. A second e-mail containing a link to your article’s proofs will be sent once typesetting is completed.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

* Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#) the journal will follow the [COPE](#) guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific

endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').)
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns,

the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency of which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information

regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers’ reports unless explicit consent has been received to share information.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers’ reports unless explicit consent has been received to share information.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial),

informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Competing Interests

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Editorial Board Members and Editors are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list we recommend they declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration. Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under 'summary of requirements' (see below) funding information should be included in the '**Declarations**' section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on **a title page that is separate from the manuscript** with a section entitled "**Declarations**" when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data, Materials and/or Code availability and Authors' contribution statements. **Please use the title page for providing the statements.**

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) competing interests and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company W and owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.
Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.
- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.
Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.
- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.
Non-financial interests: none.
- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.
Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Authors of manuscripts that describe experimental studies on either humans or animals must supply a statement that the study was approved by an institutional review committee or ethics committee and that the subjects gave informed consent. Such approval should be described in the Methods section of the manuscript. In addition, for studies conducted with human subjects, the method by which informed consent was obtained from the participants (i.e., verbal or written) also needs to be stated in the Methods section.

- If any identifying information about patients is included in the article, the following sentence should also be included:

Additional informed consent was obtained from all patients for which identifying information is included in this article.

- For studies with animals, please include the following sentence:

All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

- For articles that do not contain studies with human or animal subjects:

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on **Informed Consent**.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1^{mla(KOMP)Wsi}* **RRID:**MMRRC_055641-UCD

Cell Line: RST307 cell line **RRID:**CVCL_C321

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, **RRID:AB_2722109**

Plasmid: mRuby3 plasmid **RRID:Addgene_104005**

Software: ImageJ Version 1.2.4 **RRID:SCR_003070**

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- 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. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their

identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. [A consent to publish form can be found here. \(Download docx, 36 kB\)](#)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a ‘Declarations’ section before the reference list under a heading of ‘Consent to participate’ and/or ‘Consent to publish’. Other

declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Sample statements for **"Consent to participate"**:

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

Sample statements for **"Consent to publish"**:

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

Research Data Policy and Data Availability Statements

This journal follows Springer Nature [research data policy](#). Sharing of all relevant research data is strongly encouraged and authors must add a Data Availability Statement to original research articles.

Research data includes a wide range of types, including spreadsheets, images, textual extracts, archival documents, video or audio, interview notes or any specialist formats generated during research.

Data availability statements

All original research must include a data availability statement. This statement should explain how to access data supporting the results and analysis in the article, including links/citations to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Please see our full policy [here](#).

If it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, this statement should describe how data can be accessed and any conditions for reuse. Participant consent should be obtained and documented prior to data collection. See our [guidance on sensitive data](#) for more information.

When creating a data availability statement, authors are encouraged to consider the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article.

Further guidance on writing a data availability statement, including examples, is available at:

[Data availability statements](#)

Data repositories

Authors are strongly encouraged to deposit their supporting data in a publicly available repository. Sharing your data in a repository promotes the integrity, discovery and reuse of your research, making it easier for the research community to build on and credit your work.

See our [data repository guidance](#) for information on finding a suitable repository.

We recommend the use of discipline-specific repositories where available. For a number of data types, submission to specific public repositories is mandatory.

See our [list of mandated data types](#).

The journal encourages making research data available under open licences that permit reuse. The journal does not enforce use of particular licences in third party repositories. You should ensure you have necessary rights to share any data that you deposit in a repository.

Data citation

The journal recommends that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely. This includes data the authors are sharing alongside their publication and any secondary data the authors have reused. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI), should be included in the reference list using the minimum information recommended by [DataCite](#) (Dataset Creator, Dataset Title, Publisher [repository], Publication Year, Identifier [e.g. DOI, Handle, Accession or ARK]) and follow journal style.

See our [further guidance](#) on citing datasets.

Research data and peer review

If the journal that you are submitting to uses double-anonymous peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also anonymised. There are [data repositories that can assist with this](#) and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Support with research data policy

Authors who need help understanding our data sharing policy, finding a suitable data repository, or organising and sharing research data can consult our [Research Data Helpdesk](#) for guidance. See our [FAQ page](#) for more information on Springer Nature's research data policy.