



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO**

EMANUENE GALDINO PIRES

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À
AUTOFAGIA (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) EM NEOPLASIAS DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

CAMPINA GRANDE – PB

2020

EMANUENE GALDINO PIRES

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À
AUTOFAGIA (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) EM NEOPLASIAS DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

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

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

CAMPINA GRANDE – PB

2020

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

P667a Pires, Emanuene Galdino.
Análise da imunexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em neoplasias de glândulas salivares [manuscrito] / Emanuene Galdino Pires. - 2020.
100 p. : il. colorido.
Digitado.
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Departamento de Odontologia - CCBS."
1. Neoplasias das glândulas salivares. 2. Autofagia. 3. Imuno-histoquímica. I. Título

21. ed. CDD 616.994 31

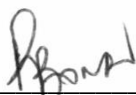
EMANUENE GALDINO PIRES

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À
AUTOFAGIA (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) EM NEOPLASIAS DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

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

Aprovada em: 09/12/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan/UEPB
Membro titular (1º Examinador)



Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy/UFPE
Membro titular (2º Examinador)



Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa/UEPB
Membro titular (3º Examinador)



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



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

DEDICATÓRIA

A **Deus**, o centro e sentido de todas as coisas;

Aos meus pais **Manoel** e **Marilene** e a minha avó **Antônia**, pelo amor incondicional e por todos os esforços para a concretização dos meus sonhos;

Ao meu esposo **Rafael Lima**, pelo amor, paciência, apoio e dedicação diários.

*“O amor humano, o amor aqui embaixo na terra,
quando é verdadeiro, ajuda-nos a saborear o amor divino”*

(S. Josemaria Escrivá)

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Cassiano Nonaka**, por todas as horas que pacientemente dedicou ao meu aprendizado e à concretização da presente pesquisa. Eu acredito que o sentido da nossa passagem por este mundo está em servir, transformar e acrescentar na vida dos demais. O seu trabalho é valioso e engrandece a vida de muitas pessoas. Aqui, agradeço em nome de todos os alunos que evoluíram, aprenderam e amadureceram sob a sua orientação. Certamente perpetuaremos o seu trabalho, transmitindo tudo que aprendemos também aos nossos discentes. Agradeço ainda em nome de todos os pacientes que foram beneficiados pelo seu conhecimento, que tiveram seu tratamento agilizado devido aqueles dias em que o senhor chegou mais cedo ou saiu mais tarde do laboratório. Admiro sua dedicação e compromisso com a UEPB e com a pesquisa, sua ética profissional e seu empenho em fazer a ciência acontecer, mesmo diante de tantas adversidades. Agradeço pelas críticas construtivas, por me orientar, fazer-se presente, investir seu tempo e acreditar no meu potencial de crescimento como pessoa, pesquisadora, professora e profissional, mesmo nos momentos em que até eu mesma duvidei. Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar condições e forças para chegar até aqui.

*Aos meus pais, **Marilene e Manoel Galdino**, por todos os ensinamentos, empenho e amor em me proporcionar todo o suporte necessário para a realização dos meus sonhos. Em especial a minha mãe, agradeço por todas as renúncias e por ser meu maior exemplo, não apenas de mulher e mãe, mas de amor à docência, inspirando em mim, desde a infância, o interesse por esta profissão.*

*À minha avó **Antônia**, por me ensinar sobre a fé, a esperança e o amor incondicional. Agradeço por cada incansável oração elevada a Deus em prol da minha felicidade e por estar presente, mesmo distante, nos bons e maus momentos.*

*Aos meus irmãos **Emanuel Marlon e Efraim**, pelo amor, companheirismo e parceria de uma vida inteira.*

*Ao meu esposo **Rafael Lima**, por todo amor e paciência que demonstrou durante todo este tempo. Agradeço por fazer dos meus sonhos os seus e por tornar tudo mais fácil com a sua paciência e tranquilidade. Você me transmitiu paz em todos os momentos de agitação e me consolou nos de tristeza. Suportou minhas ausências sem reclamar, sabendo que eu estava lutando por um sonho, que o caminho era longo e que eu precisava de todo o suporte possível. Esta vitória é metade minha e metade sua. Obrigada por tudo! Te amo!*

*À toda a família **Galdino Pires e Lima Barbosa**, por todo o carinho e palavras de incentivo. Em especial a tia **Fátima Galdino**, pela solicitude e generosidade constantes.*

*Aos amigos do Programa de Pós-graduação, especialmente da minha **turma de Doutorado 2016.2**, pela convivência e troca de conhecimentos durante as disciplinas.*

*Aos amigos dos Laboratórios de Imunoistoquímica e Histopatologia Oral da UEPB: **Allany, Amanda, Christany, Daniella, Fabiana, Ingrid, José de Alencar, Luan, Luana, Marayza, Rodolfo, Robeci, Thamyres, Walter e Wliana**. Compartilhamos momentos e experiências que contribuíram para amenizar e superar cada obstáculo que se apresentou durante este percurso. Vocês tornaram esta caminhada mais leve!*

*À **Allany Andrade e Luana Balduino**, por todo o auxílio nas etapas finais da execução desta pesquisa. Agradeço também pela amizade, pelas palavras de motivação e pelos conhecimentos e momentos compartilhados.*

À **Ingrid Morgana**, por ser um dos maiores presentes que a pós-graduação me proporcionou. Desde o mestrado tem sido uma parceira nas pesquisas, trabalhos e viagens e uma irmã para a vida. Sempre gentil, bondosa e sorridente, transmitiu tranquilidade e paz nos momentos turbulentos. Me espelho no seu exemplo de mulher e profissional. Seu apoio foi fundamental em várias ocasiões desta caminhada e sempre serei grata por este carinho incondicional e pela oportunidade de pertencer ao seu círculo de amizades.

À **Daniella Morais**. Compartilhamos sorrisos, lágrimas, histórias e trabalhos. Sua companhia trouxe euforia e agitação nos momentos de lassidão e sua amizade foi suporte para o meu crescimento como amiga e profissional. Agradeço por todo carinho dispensado a mim durante este tempo.

À **Fabiana Medeiros**, por ser meu exemplo de estabilidade emocional, serenidade e tranquilidade diante das intempéries da vida. Aprendi muito com você e levo cada um destes ensinamentos para sempre. Sou grata pela amizade e por todos os momentos que compartilhamos.

A **Luan Barnabé**, por sua parceria em tantos momentos. Inteligente, divertido e generoso sempre ofereceu seu ombro amigo e palavras de motivação em inúmeras ocasiões.

A **Lúcio Castellano** e **Brenna Louise**, por compartilharem conhecimentos, viagens e histórias. Agradeço pela amizade e pelo apoio em todas as etapas. Sempre presentes, iluminaram meu caminho em muitos momentos.

Às eternas amigas: **Ayonara**, **Fernanda** e **Suzy**. Mesmo distantes geograficamente, sempre se fizeram presentes. Ouviram, confortaram e alegraram meus dias. Sempre serei grata por estes mais de 10 anos de amizade, embasada na confiança e carinho recíprocos.

Às técnicas **Ana Luzia Batista** e **Denize Souza**. Não tenho palavras para agradecer toda a cooperação para a concretização desta pesquisa. Sempre com um sorriso no rosto, estavam prontas a ajudar, ouvir e aconselhar.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta tese: **Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan**, **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy**, **Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa**, **Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, **Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel** e **Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves**, que gentilmente aceitaram o convite, pela dedicação na leitura e pelas contribuições que serão apresentadas. Em especial, agradeço ao professor **Dr. Paulo Bonan**, modelo de profissional ético, justo, bondoso e sábio, pela orientação durante o mestrado e por acompanhar minha trajetória me incentivando pelo caminho da pesquisa e da docência.

À professora **Dra. Pollianna**, exemplo de mulher, docente e pesquisadora. Agradeço pelos preciosos ensinamentos e conselhos que me deu, sobre a patologia, a pesquisa, a docência e a vida.

Ao professor **Dr. Tiago João**, por sua paciência e solicitude. Sempre alegre, humilde e gentil, muito auxiliou no meu crescimento como professora.

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

A todos os professores que fazem parte do PPGO-UEPB, por todos os ensinamentos transmitidos durante as aulas, palestras, conversas e parcerias. Em especial às Profas. **Dra. Daliana Queiroga** e **Dra. Jozinete Vieira Pereira**, por todo o conhecimento que me proporcionaram adquirir nas clínicas do LINCCO e pelos conselhos e sorrisos durante as caronas semanais.

À UEPB, que proporcionou grande parte da minha formação acadêmica. Sempre me lembrarei com carinho dos 5 anos de graduação e dos 4 anos de doutorado que cursei nessa Instituição. Adquiri, nesse tempo, muitos conhecimentos e amigos que levarei para a vida.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia da UEPB. Em especial à secretária do PPGO-UEPB, **Ahyanna Nóbrega**, pela atenção e disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

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

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

RESUMO

RESUMO

O adenoma pleomórfico (AP), o adenocarcinoma polimorfo (ACP), o carcinoma mucoepidermoide (CME) e o carcinoma adenoide cístico (CAC) são neoplasias de glândulas salivares que apresentam importantes diferenças na sua etiopatogênese, características histopatológicas e comportamentos clínicos. No contexto do desenvolvimento e progressão de neoplasias, estudos têm destacado a participação de um mecanismo intracelular catabólico que atua em processos fisiológicos e patológicos, denominado autofagia. Esse mecanismo envolve a participação de diversas moléculas, com destaque para as proteínas Atg7, LC3, p62 e p-mTOR. Pesquisas sobre a autofagia em neoplasias de glândulas salivares são recentes e direcionadas, especialmente, ao CAC. Além disso, esses estudos analisaram um pequeno número de proteínas relacionadas à autofagia, com destaque para LC3 e mTOR. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a imunexpressão de quatro proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares. A amostra foi constituída por 20 APs, 20 ACPs, 20 CMEs e 14 CACs. No estudo morfológico, foram analisados os subtipos histopatológicos dos APs (rico em células e pobre em células) (SOARES *et al.*, 2009) e dos CACs (cribriforme, tubular e sólido) (ELLIS; AUCLAIR, 2008). De acordo com o grau histopatológico de malignidade, os CMEs foram classificados em: grau I, grau II e grau III (BRANDWEIN *et al.*, 2001). No estudo imunoistoquímico, foram estabelecidos os percentuais de células neoplásicas positivas (citoplasma e núcleo) em 5 campos de maior imunorreatividade (400×) aos anticorpos anti-Atg7, anti-LC3A, anti-p62 e anti-p-mTOR (OUYANG *et al.*, 2017). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio dos testes de Mann-Whitney e de correlação de Spearman ($p < 0,05$). Foi constatada maior frequência de APs ricos em células (60,0%) e de CACs dos subtipos cribriforme (42,85%) e tubular (42,85%). Em relação ao grau histopatológico de malignidade dos CMEs, houve predomínio de casos com grau I (45,0%) e grau II (45,0%). Foi observada expressão citoplasmática de Atg7 em todos os grupos analisados, com altos percentuais medianos de positividade. Para LC3A, foi constatada imunopositividade citoplasmática na maioria dos ACPs (95,0%) e em todos os casos de AP, CME e CAC. Em relação à p62, os menores percentuais de expressão citoplasmática foram observados nos CACs e nos APs, ambos com diferença significativa quando comparados aos CMEs e ACPs ($p < 0,05$). Os maiores percentuais de expressão nuclear de p62 foram observados nos APs, com diferença estatisticamente significativa em comparação aos ACPs e CACs ($p < 0,005$). Os CACs apresentaram menores percentuais de positividade citoplasmática para p-mTOR quando

comparados aos demais grupos de lesões ($p < 0,005$). Em relação à expressão nuclear de Atg7, LC3A e p-mTOR, todos os grupos apresentaram baixos percentuais de positividade. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunexpressão das proteínas relacionadas à autofagia de acordo com o subtipo histológico dos APs e CACs e o grau histopatológico de malignidade dos CMEs. Nos APs, CMEs e CACs, foram constatadas correlações positivas entre as imunexpressões de proteínas relacionadas à autofagia ($p < 0,05$). Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem um potencial envolvimento da autofagia na patogênese de APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares. A regulação positiva da autofagia e a translocação nuclear reduzida da proteína p62 podem contribuir para o comportamento biológico agressivo do CAC de glândulas salivares.

Palavras-chave: Neoplasias das glândulas salivares. Autofagia. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

ABSTRACT

Pleomorphic adenoma (PA), polymorphous adenocarcinoma (PAC), mucoepidermoid carcinoma (MEC) and adenoid cystic carcinoma (ACC) are salivary gland neoplasms that exhibit important differences in their etiopathogenesis, histopathological characteristics and clinical behaviors. In the context of neoplastic development and progression, studies have highlighted the participation of an intracellular catabolic mechanism involved in physiological and pathological processes, denominated autophagy. This mechanism involves several molecules, with emphasis on Atg7, LC3, p62 and p-mTOR proteins. Investigations on autophagy in salivary gland neoplasms are recent and directed, especially, at ACC. In addition, these studies analyzed a small number of autophagy-related proteins, with emphasis on LC3 and mTOR. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunoeexpression of four autophagy-related proteins (Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR) in PAs, PACs, MECs and ACCs of salivary glands. The sample consisted of 20 PAs, 20 PACs, 20 MECs and 14 ACCs. In the morphological study, the histopathological subtypes of PAs (cell-rich and cell-poor) (SOARES *et al.*, 2009) and ACCs (cribriform, tubular and solid) (ELLIS; AUCLAIR, 2008) were analyzed. According to the histopathological grade of malignancy, MECs were classified as: grade I, grade II and grade III (BRANDWEIN *et al.*, 2001). In the immunohistochemical study, the percentages of positive neoplastic cells (cytoplasm and nucleus) in 5 fields of highest immunoreactivity (400×) for anti-Atg7, anti-LC3A, anti-p62 and anti-p-mTOR antibodies were determined (OUYANG *et al.*, 2017). The data obtained were statistically analyzed using the Mann-Whitney test and Spearman's correlation test ($p < 0.05$). There was a higher frequency of cell-rich PAs (60.0%) and cribriform (42.85%) and tubular (42.85%) ACCs. Regarding the histopathological grade of malignancy of MECs, there was a predominance of cases with grade I (45.0%) and grade II (45.0%). Cytoplasmic expression of Atg7 was observed in all groups analyzed, with high median percentages of positivity. For LC3A, cytoplasmic immunopositivity was found in most PACs (95.0%) and in all cases of PA, MEC and ACC. Regarding p62, the lowest percentages of cytoplasmic expression were observed in PAs and ACCs, both with significant difference compared to PACs and MECs ($p < 0.05$). The highest percentages of nuclear expression of p62 were observed in PAs, with statistically significant difference compared to PACs and ACCs ($p < 0.005$). ACCs showed lower percentages of cytoplasmic positivity for p-mTOR compared to other groups of lesions ($p < 0.005$). Regarding nuclear expression of Atg7, LC3A and p-mTOR, all groups exhibited low median percentages of positivity. There were no statistically significant differences in the immunoeexpression of

autophagy-related proteins according to the histopathological subtypes of PAs and ACCs and the histopathological grade of malignancy of MECs. In PAs, MECs and ACCs, positive correlations were observed between the immunoexpressions of autophagy-related proteins ($p < 0.05$). In conclusion, the results of this study suggest the potential involvement of autophagy in the pathogenesis of PA, PAC, CME and ACC of salivary glands. The upregulation of autophagy and the reduced nuclear translocation of protein p62 may contribute to aggressive biological behavior of ACC of salivary glands.

Keywords: Salivary gland neoplasms. Autophagy. Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP:	Adenocarcinoma polimorfo.
AFIP:	Do inglês <i>Armed Forces Institute of Pathology</i> , traduzido como Instituto de Patologia das Forças Armadas.
AP:	Adenoma pleomórfico.
Atg7:	Do inglês <i>autophagy-related protein 7</i> , traduzido como proteína 7 relacionada à autofagia.
CAC:	Carcinoma adenoide cístico.
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
cAMP:	Do inglês <i>adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate</i> , traduzido como adenosina 3',5'-monofosfato cíclico.
CME:	Carcinoma mucoepidermoide.
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
CTNNB1:	Do inglês <i>catenin (cadherin associated protein) beta 1</i> , refere-se ao gene <i>CTNNB1</i> .
CREB:	Do inglês <i>cAMP-responsive element-binding protein</i> , traduzido como proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP cíclico.
DNA:	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucleico.
EGFR:	Do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i> , traduzido como receptor do fator de crescimento epidérmico.
eIF4E:	Do inglês <i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i> , traduzido como fator de iniciação da tradução 4F.
FIP200:	Do inglês <i>family interacting protein of 200 kD</i> , traduzido como proteína de interação com a família FAK de 200 kD.
FKBP8:	Do inglês <i>FK506-binding protein 8</i> , refere-se à proteína FKBP8 ou ao gene <i>FKBP8</i> .
FUNDC1:	Do inglês <i>FUN14 domain containing 1</i> , refere-se à proteína FUNDC1 ou ao gene <i>FUNDC1</i> .
°GL:	Grau <i>Gay Lussac</i> , representa a porcentagem de álcool puro presente em uma mistura.
HCl:	Ácido clorídrico.
HER2:	Do inglês <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , traduzido como receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano.
IGF2:	Do inglês <i>insulin-like growth factor II</i> , traduzido como fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2.
LAMP2-A:	Do inglês <i>lysosomal associated membrane protein 2</i> , traduzido como proteína de membrana associada ao lisossomo tipo 2.
LC3:	Do inglês <i>microtubule-associated protein 1-light chain 3</i> , traduzido como cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos.
LIR:	Do inglês <i>LC3-interacting region</i> , refere-se a região de interação com LC3 da proteína p62.
MAML2:	Do inglês <i>mastermind-like 2</i> , refere-se ao gene <i>MAML2</i> .

MECT1:	Do inglês <i>mucoepidermoid carcinoma translocated gene-1</i> , refere-se ao gene <i>MECT1</i> .
MYB:	Do inglês <i>myeloblastosis</i> , refere-se ao gene <i>MYB</i> ou a proteína Myb.
mTOR:	Do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i> , traduzido como proteína alvo da rapamicina em mamíferos.
NFIB:	Do inglês <i>nuclear factor one B</i> , refere-se ao fator de transcrição nuclear I/B.
p-Akt:	Do inglês <i>phospho-Akt</i> , traduzido como Akt fosforilada.
pH:	Potencial Hidrogeniônico.
PLAG1:	Do inglês <i>pleomorphic adenoma gene 1</i> , refere-se ao gene <i>PLAG1</i> .
PRKD:	Do inglês <i>protein kinase D</i> , refere-se ao gene <i>PRKD</i> .
OMS:	Organização Mundial de Saúde.
p62:	Do inglês <i>protein 62</i> , refere-se ao gene <i>P62</i> ou à proteína p62.
RNF168:	Do inglês <i>ring finger protein 168</i> , refere-se à proteína RNF168.
SPSS:	Do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> , traduzido como Pacote Estatístico para Ciências Sociais.
SQTSM1:	Do inglês <i>sequestosome 1</i> , traduzido como sequestossomo 1.
S6:	Refere-se à proteína ribossomal S6.
TFIIE:	Do inglês <i>transcription factor II E</i> , traduzido como fator de transcrição II E.
TFIIH:	Do inglês <i>transcription factor II H</i> , traduzido como fator de transcrição II H.
TMA:	Do inglês <i>tissue microarray</i> , traduzido como microarranjo tecidual.
TNM:	Do inglês <i>Tumor; Nodes; Metastases</i> . traduzido como Tumor; Nodos; Metástases.
TRIS:	Do inglês <i>tris-hydroxymethyl-aminomethane</i> , traduzido como tris-hidroximetil-aminometano.
UBA:	Do inglês <i>ubiquitin-associated</i> , refere-se ao domínio de associação à ubiquitina da proteína p62.
UEPB:	Universidade Estadual da Paraíba.
UNIFOR:	Universidade de Fortaleza.
ULK-1:	Do inglês <i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1</i> , traduzido como quinase 1 semelhante a Unc-51.
µm:	Micrômetro.
4EBP1:	Do inglês <i>eukaryotic initiation factor 4E binding protein 4E</i> , traduzido como proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1. Características histopatológicas para gradação do CME, adaptado de Brandwein <i>et al.</i> (2001).....	28
Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.....	41
Quadro 3. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.....	41
Quadro 4. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	44
Figura 1. Maquinaria molecular envolvida na autofagia.....	33
Figura 1. Imunoexpressão de Atg7 em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus TM , 200×).....	67
Figura 2. Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade em citoplasma (A) e núcleo (B) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de lesões.....	68
Figura 3. Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade citoplasmática para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao subtipo histológico dos APs (A) e CACs (B) e ao grau histológico de malignidade dos CMEs (C).....	69
Figura 4. Imunoexpressão de LC3A em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus TM , 200×).....	70
Figura 5. Imunoexpressão de p62 em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus TM , 200×).....	71
Figura 6. Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade nuclear para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao subtipo histológico dos APs (A) e CACs (B) e ao grau histológico de malignidade dos CMEs (C).....	72
Figura 7. Imunoexpressão de p-mTOR em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus TM , 400×).....	73

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	65
Tabela 2. Tamanho da amostra, número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (núcleo e citoplasma) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de lesões.....	66

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	26
2	Objetivos.....	38
2.1	Objetivo Geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	METODOLOGIA.....	40
3.1	Considerações éticas.....	40
3.2	Caracterização do estudo.....	40
3.3	População.....	40
3.4	Amostra.....	40
3.4.1	<i>Critérios de inclusão.....</i>	40
3.4.2	<i>Critérios de exclusão.....</i>	41
3.5	Variáveis.....	41
3.6	Estudo morfológico.....	42
3.7	Estudo imunoistoquímico.....	42
3.7.1	<i>Método imunoistoquímico.....</i>	42
3.7.2	<i>Análise imunoistoquímica.....</i>	45
3.8	Análise estatística.....	45
4	ARTIGO.....	47
4.1	Apresentação.....	47
4.2	Artigo a ser submetido.....	48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICES.....	83
	ANEXOS.....	85

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Neoplasias de glândulas salivares são um complexo grupo de lesões que representam de 3% a 6% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço e são caracterizadas pela diversidade de características histopatológicas e comportamentos clínicos (GRIFFITH *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2018). Tal complexidade é atribuída a sua heterogeneidade histogenética, associada à capacidade das suas células em diferenciar-se em vários subtipos morfológicos, os quais resultam em diversos padrões arquiteturais (SEETHALA, 2017; BADLANI *et al.*, 2018). O conhecimento ainda incompleto sobre a patogênese dessas lesões, aliado à diversidade de apresentações clínicas e padrões histopatológicos, torna o diagnóstico e manejo dos pacientes portadores de neoplasias de glândulas salivares um verdadeiro desafio (FERRELL; MACE; CLAYBURGH, 2019).

O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna mais frequente, perfazendo 47,4% a 54% de todos os casos de neoplasias de glândulas salivares (DA SILVA *et al.*, 2018; SENTANI *et al.*, 2019). Sua histogênese tem sido associada à proliferação desordenada de células ductais e mioepiteliais e aproximadamente 70% dessas lesões apresentam alterações genéticas, especialmente rearranjos envolvendo o cromossomo 8q12 (TRIANTAFYLLOU *et al.*, 2015; ASAHINA *et al.*, 2019).

O gene-alvo no cromossomo 8q12 é denominado *PLAG1* e sua atividade oncogênica tem sido relacionada à regulação positiva da expressão do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF-2). Este último é capaz de estimular a proliferação celular por meio de mecanismos autócrinos ou parácrinos. Vários genes têm sido envolvidos na fusão com o gene *PLAG1*, destacando-se principalmente o gene que codifica a β -catenina, designado *CTNNB1*, o que pode levar à superexpressão da oncoproteína *PLAG1* (ARSLAN *et al.*, 2017; KATABI *et al.*, 2018; ASAHINA *et al.*, 2019).

O AP se caracteriza pelo crescimento lento e de caráter expansivo, determinando a compressão dos tecidos circunvizinhos (ALMESLET, 2020). A maioria dos casos é diagnosticada em glândula parótida. Quando em cavidade oral, estudos têm destacado o palato como a localização mais frequente para essa lesão (DA SILVA *et al.*, 2018; VALSTAR *et al.*, 2017).

Em relação as suas características histopatológicas, o AP se destaca pela variabilidade arquitetural e celular. Podem ser observadas células ductais e mioepiteliais arranjadas em uma grande variedade de padrões, incluindo lençóis, fascículos interconectantes e estruturas ductiformes. Tais células se encontram imersas em um estroma escasso ou abundante, que pode

ser do tipo mixoide, fibroso, condroide, vascular ou mixocondroide (TRANTAFYLLOU *et al.*, 2015). Levando-se em consideração a ampla variabilidade arquitetural e celular, Soares *et al.* (2009) sugeriram que, dependendo da celularidade da lesão, mudanças na demanda metabólica podem ser esperadas. Assim, os autores classificaram as lesões de acordo com a quantidade celular e a composição do estroma em: tumores ricos em células (predomínio de células epiteliais) e tumores pobres em células (predomínio de áreas mixoides e condroides).

Em relação ao tratamento de escolha para o AP, é indicada a excisão cirúrgica com remoção total ou parcial da glândula associada. Embora essa neoplasia apresente curso clínico indolente e bom prognóstico, recorrências têm sido relatadas em 2,8% a 4,6% dos casos, usualmente nos primeiros 5 anos. Além disso, cerca de 3,2% dos APs podem apresentar transformação para carcinoma ex-AP, uma neoplasia maligna que exibe comportamento agressivo com desenvolvimento de metástases regionais e distantes para pulmões, ossos e vísceras (ANDREASEN *et al.*, 2015; VALSTAR *et al.*, 2017).

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a neoplasia maligna de glândula salivar mais frequente, correspondendo de 26% a 33% dos casos de neoplasias malignas de glândulas salivares (DA SILVA *et al.*, 2018; SENTANI *et al.*, 2019). Sua patogênese tem sido associada a translocações entre cromossomos 19 e 11, que resultam na fusão dos genes *MECT1* e *MAML2* (CHEN *et al.*, 2015; GRIFFITH *et al.*, 2017; YAN, *et al.*, 2018). *MECT1* é uma proteína que atua como coativador da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP cíclico (CREB), um fator de transcrição envolvido na progressão tumoral por conferir resistência à apoptose e estimular o crescimento celular e a angiogênese (CHEN *et al.*, 2015; STEVEN; SELIGER, *et al.*, 2016). A *MAML2* é uma proteína que ativa a via de sinalização Notch, que também participa na regulação transcricional. Sugere-se que a proteína de fusão *MECT1-MAML2* pode ativar tanto os alvos de sinalização Notch quanto os alvos cAMP/CREB (YAN, *et al.*, 2018).

O CME é diagnosticado com maior frequência na glândula parótida, seguida pelas glândulas salivares menores presentes no palato (DA SILVA *et al.*, 2018; SENTANI *et al.*, 2019), e se apresenta como um aumento de volume assintomático, de consistência firme, podendo ter sua superfície ulcerada (SARMENTO *et al.*, 2016). A coloração pode variar do azulado ao vermelho ou púrpura, o que pode conferir à lesão aparência clínica semelhante a mucocelos ou lesões de origem vascular (MARIZ *et al.*, 2019).

Ao exame histopatológico, o CME é caracterizado pela proliferação de três tipos celulares básicos: células mucosas, epidermoides e intermediárias. Também pode apresentar células claras, cúbicas e cilíndricas altas. As células citadas anteriormente podem se arranjar em ilhas, lençóis, ninhos ou, ainda, formar espaços císticos de diversos tamanhos. A proporção

entre componentes sólidos e císticos varia dentro de um mesmo CME e pode refletir o seu comportamento biológico (ELLIS; AUCLAIR, 2008; KATABI *et al.*, 2014). Nesse sentido, diversos sistemas de gradação histopatológica de malignidade foram propostos com o objetivo de auxiliar na determinação da agressividade biológica dessas neoplasias, com destaque para aqueles desenvolvidos por Brandwein *et al.* (2001), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (GOODE; EL-NAGGAR, 2005) e pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP) (ELLIS; AUCLAIR, 1996; ELLIS; AUCLAIR, 2008).

Brandwein *et al.* (2001) constataram que alguns pacientes com CMEs de baixo grau, pelos critérios da AFIP, evoluíam com o desenvolvimento de metástases e morte relacionada à doença. Dessa forma, a partir de modificações no sistema proposto pela AFIP, esses autores sugeriram um sistema de gradação histopatológica para o CME (QUADRO 1) com melhor valor preditivo. Nesse contexto, Cipriani *et al.* (2019) avaliaram 4 sistemas de gradação histopatológica de malignidade para os CMEs e sua relação com o prognóstico. De acordo com os autores, o alto grau de malignidade do CME, determinado pelo sistema de Brandwein *et al.* (2001), seria o melhor preditor do comportamento biológico mais agressivo dessa lesão.

Quadro 1. Características histopatológicas para gradação do CME, adaptado de Brandwein *et al.* (2001).

Grau	Achados característicos	Características que definem o grau
I	Células mucosas predominantes; células intermediárias e formações císticas podem ser proeminentes e padrão de crescimento circunscrito.	Ausência de características do Grau III e do padrão agressivo de invasão.
II	Células intermediárias predominantes sobre células mucosas, sendo a maior parte em arranjo mais sólido, células escamosas podem ser vistas.	Padrão agressivo de invasão, ausência de características definidas do grau III.
III	Predominância de células escamosas, células intermediárias e mucosas também devem estar presentes, a maioria em arranjo tumoral sólido.	Necrose, invasão vascular, óssea e perineural, > 4 mitoses por 10 campos em maior aumento, alto grau de pleomorfismo nuclear.
Características		Pontos
Componente intracístico < 25%		2
Front de invasão tumoral em pequenos ninhos e ilhas		2
Atipia nuclear pronunciada		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

O tratamento de escolha para o CME é a ressecção cirúrgica. Em casos com alto grau de malignidade, a radioterapia pós-operatória pode auxiliar no tratamento (FERRELL; MACE; CLAYBURGH, 2019). Diversos estudos têm destacado a relação entre grau histopatológico de malignidade e agressividade biológica em CMEs. Tumores de baixo grau, geralmente, têm um melhor prognóstico, enquanto os tumores de grau intermediário e de alto grau possuem maior tendência para infiltrar, recidivar e produzir metástases (XU, W. *et al.*, 2017; GRANIC *et al.*, 2018; CIPRIANI *et al.*, 2019). Coerentemente, Cipriani *et al.* (2019) verificaram que 44% dos CMEs de cabeça e pescoço de alto grau, classificados de acordo com os parâmetros de Brandwein *et al.* (2001), apresentaram recorrência.

Outra neoplasia maligna de glândulas salivares, com prevalência próxima à observada para o CME, é o carcinoma adenoide cístico (CAC), representando cerca de 22,5% a 27% dos casos (DA SILVA *et al.*, 2018; SENTANI *et al.*, 2019). É uma lesão de comportamento biológico agressivo, cuja etiopatogênese tem sido relacionada com a translocação entre os cromossomos 6 e 9, resultando no gene de fusão *MYB-NFIB* (XU, B. *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018). A proteína de fusão MYB-NFIB ativa a transcrição de oncoproteínas alvos de MYB, especialmente aquelas codificadas por genes envolvidos na apoptose, bem como na proliferação e diferenciação celulares (GRIFFITH *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018).

Entre as localizações mais comuns para o desenvolvimento do CAC, estão a glândula parótida, a glândula submandibular e as glândulas salivares menores, com destaque para aquelas localizadas no palato (DA SILVA *et al.*, 2018). Clinicamente, os CACs se apresentam como lesões nodulares, de crescimento lento e persistente, que frequentemente causam infiltração tecidual e dor, em decorrência da propensão à invasão perineural. Se destacam, ainda, pelo potencial para desenvolver metástases à distância tardias (BJØRNDAL *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2017; XU, B. *et al.*, 2017).

Em relação às características histopatológicas, os CACs demonstram a participação de dois tipos celulares principais: células epiteliais ductais (luminais) e células mioepiteliais (não

luminais), com predomínio destas últimas. Tipicamente, tais células se arranjam em três padrões de crescimento: cribriforme, tubular e sólido. Na maioria dos casos, porém, existe uma combinação desses padrões (EL-NAGGAR, HUVOS, 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008; HE *et al.*, 2017). Assim, Ellis e Auclair (2008) sugeriram a classificação dos CACs em: cribriformes (tumores cribriformes puros ou associados com menos de 30% de áreas sólidas), tubulares (tumores com áreas tubulares e cribriformes, sem componentes sólidos) e sólidos (padrão predominantemente sólido).

O padrão cribriforme é caracterizado pela presença de células que variam de arredondadas à cuboidais, com núcleo basofílico, arranjas em ilhas que contêm múltiplos espaços cilíndricos, semelhantes a espaços císticos. No padrão tubular, observam-se múltiplas estruturas semelhantes a pequenos ductos ou túbulos. O padrão sólido, por sua vez, é caracterizado por massas sólidas de células epiteliais e mioepiteliais, com pouca tendência para formação de estruturas ductiformes e espaços pseudocísticos. Em contraposição aos padrões cribriforme e tubular, figuras de mitose e focos de necrose em meio às ilhas tumorais podem ser observados no padrão sólido (EL-NAGGAR; HUVOS, 2005; ELLIS; AUCLAIR, 2008). Lesões que exibem este último padrão tendem a apresentar um pior prognóstico (XU, B. *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017).

O tratamento de escolha para o CAC é a excisão cirúrgica. Nos casos mais graves, a remoção cirúrgica da lesão pode ser associada à radioterapia pós-operatória (BADLANI *et al.*, 2018; FERRELL; MACE; CLAYBURGH, 2019). O CAC não é encapsulado e apresenta alto índice de recidiva e disseminação sistêmica. Em 5 anos, após o tratamento, o percentual de pacientes livres da doença varia de 59,7% a 66%. Esse percentual diminui para 38% a 44% em 10 anos (OUYANG *et al.*, 2017a; XU, B. *et al.*, 2017), e apenas 20% em 15 anos (OUYANG *et al.*, 2017a).

Por sua vez, o adenocarcinoma polimorfo (ACP) é uma neoplasia maligna que representa de 0,44% a 17,1% de todos os tumores de glândula salivar. Estudos revelam que a patogênese dessa neoplasia maligna envolve mutações que resultam na ativação do gene *PRKDI*, aumentando a proliferação celular (GRIFFITH *et al.*, 2017; ROY *et al.*, 2017; ANDREASEN *et al.*, 2018; VANDER POORTEN *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2018). As proteínas quinases D (PRKD) consistem em uma família de serina/ treonina quinases evolutivamente conservadas, cujas funções incluem proliferação celular, sobrevivência, migração, angiogênese, regulação da expressão gênica e tráfego de proteínas através da membrana (ROY *et al.*, 2017).

O ACP ocorre quase que exclusivamente em glândulas salivares menores, especialmente as localizadas em palato. Geralmente se apresenta como um aumento de volume circunscrito, indolor e de crescimento lento, com baixo potencial metastático. Ocasionalmente, está associado à hemorragia, telangiectasia e ulceração da mucosa sobrejacente, podendo erodir ou infiltrar o osso subjacente (FONSECA *et al.*, 2017; VANDER POORTEN *et al.*, 2018). É caracterizado por uniformidade citológica, diversidade morfológica e padrão de crescimento infiltrativo, com feixes de células que possuem formato arredondado e/ou poligonal, com núcleo esférico, fusiforme ou ovoide e citoplasma de coloração variada (ELLIS; AUCLAIR, 2008; FONSECA *et al.*, 2017).

O tratamento de escolha para o ACP é a excisão cirúrgica e o prognóstico geralmente é bom. A recorrência local é observada em 4% a 10% (ELHAKIM *et al.*, 2016; MIMICA *et al.*, 2019) dos casos e a sobrevida doença-específica em 5 e 10 anos é de, aproximadamente, 98% e 94%, respectivamente (MIMICA *et al.*, 2019).

No contexto do desenvolvimento e progressão de neoplasias diversas, estudos têm destacado a participação da autofagia (ETTL *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2012; GALLUZZI *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2020). A autofagia (*auto*-próprio + *fagia*- comer, alimentar-se) constitui-se em um mecanismo de sobrevivência celular, em que organelas e outros componentes citoplasmáticos são sequestrados em vacúolos autofágicos que se fundem com lisossomos para que depois sejam eliminados ou reutilizados. Assim, permite a regulação do volume e a renovação de componentes celulares. Em condições patológicas, como oxidação lipídica, estresse metabólico e oxidativo, esse processo torna-se notadamente ativo (WALKER; KTISTAKIS, 2019; GROSS; GRAEF, 2020).

O processo autofágico mais estudado é a macroautofagia (mais conhecida, e daqui em diante tratada apenas como autofagia), considerada a principal via responsável pela degradação de agregados proteicos e o *turnover* de organelas (GROSS; GRAEF, 2020). Pode atuar como um processo específico para uma organela ou estrutura, recebendo denominações particulares, como: mitofagia (mitocôndrias), reticulofagia (retículo endoplasmático), pexofagia (peroxissomos) e nucleofagia (núcleo) (AKINDURO *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2016; GROSS; GRAEF, 2020).

A autofagia compreende uma sequência de eventos, cuja etapa inicial é denominada nucleação ou iniciação, onde ocorre o desenvolvimento de uma membrana lipídica dupla, o fagóforo, que engloba componentes citoplasmáticos para degradação. Essa membrana lipídica se fecha, formando uma vesícula, designada autofagossomo. Este se funde com os lisossomos, formando o autolisossomo. Desse modo, os componentes celulares são degradados e reciclados

em um ambiente ácido composto por hidrolases lisossomais (FIGURA 1) (SCHAAF *et al.*, 2016; GROSS; GRAEF, 2020).

Um grupo de proteínas da família dos genes relacionados à autofagia (ATG) necessita ser ativado para que este processo ocorra (LI *et al.*, 2020). Assim, a proteína Atg7, semelhante a ubiquitina-ligase E1, ativa as proteínas semelhantes à ubiquitina Atg12 e Atg8. A Atg12 é covalentemente ligada a Atg5 e este sistema de conjugação interage com Atg16, formando um oligômero que é direcionado à membrana do autofagossomo (SCHAAF *et al.*, 2016; WALKER; KTISTAKIS, 2019).

A Atg mais importante na etapa do sequestro e formação do autofagossomo é a Atg8, também denominada cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3). Há 3 subtipos de LC3, denominados A, B e C, cujas funções individuais na autofagia não são, ainda, totalmente conhecidas. A LC3 pode ser encontrada, ainda, em duas isoformas. A LC3-I (localizada no citosol) sofre lipidação por Atg7 e é acoplada à membrana do autofagossomo que está sendo formado e passa a ser denominada LC3-II. A porção de LC3-II presente na membrana interna é degradada no autolisossomo. A associação específica de LC3-II com a membrana do autofagossomo torna essa proteína um excelente marcador de indução de autofagia (SCHAAF *et al.*, 2016; WALKER; KTISTAKIS, 2019).

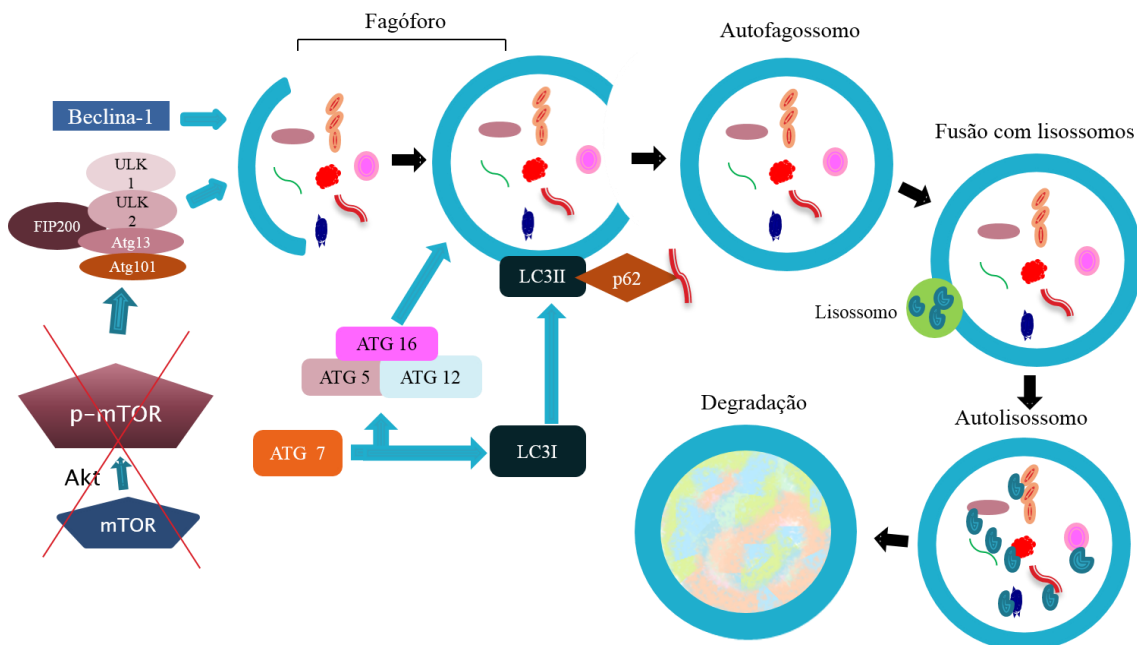
A LC3-II se liga ao domínio LIR da proteína p62, que é uma proteína de adaptação multifuncional e ligante de ubiquitina presente em vários processos celulares. Sob condições de estresse metabólico, há acúmulo de estruturas danificadas nas células e aumenta a expressão de p62, que marca estas estruturas para serem degradadas no autofagossomo, por meio da interação com a LC3-II. Além disso, essa proteína se liga a proteínas ubiquitinizadas, por meio do seu domínio UBA, conduzindo-as para a degradação proteossomal (KATSURAGI *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2018; WALKER; KTISTAKIS, 2019).

A p62 também é essencial para a ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) em situações de abundância de aminoácidos. Esta última é a principal controladora da ativação/repressão da autofagia em resposta a condições celulares fisiológicas e de estresse (KATSURAGI *et al.*, 2015). Além da autofagia, mTOR é o componente-chave que coordena diversas funções celulares, como a transcrição e o início da tradução, crescimento celular e proliferação, biogênese de ribossomos e reorganização do citoesqueleto (LI; HE; MA, 2020; MARQUARD; JÜCKER, 2020).

Em situações de abundância de nutrientes, a mTOR é fosforilada pela proteína Akt (sendo então denominada, p-mTOR). Uma vez ativada, a mTOR inibe a função das proteínas Atg13, Atg101, FIP200 e quinase 1 semelhante a Unc-51 (UKL1). Esses componentes,

juntamente com o complexo da Beclina-1, são essenciais para o alongamento do fagóforo, englobando os componentes citoplasmáticos para degradação. Quando há a formação do complexo, a autofagia é inibida, enquanto em situações de privação de nutrientes na célula ou na presença de inibidores de mTOR, a autofagia é estimulada para que se possa manter a homeostase celular (FIGURA 1) (LI; HE; MA, 2020; MARQUARD; JÜCKER, 2020).

Figura 1. Maquinaria molecular envolvida na autofagia.



Legenda: Situações de estresse metabólico ou escassez de nutrientes inibem mTOR e a sua fosforilação por Akt. Quando ativada, a mTOR inibe a função das proteínas ULK1, Atg13, FIP200 e Atg101, que juntamente com o complexo da Beclina-1 são essenciais para o alongamento do fagóforo. A proteína Atg7 ativa Atg12, a qual é covalentemente ligada a Atg5 e este sistema de conjugação interage com Atg16, formando um oligômero que é direcionado à membrana do autofagossomo. A LC3-I sofre lipidação por Atg7 e se acopla à membrana do autofagossomo em formação, passando a ser denominada LC3-II. A p62 marca estruturas para serem degradadas no autofagossomo, por meio da interação com LC3-II.

Fonte: Li, He e MA (2020).

O papel da autofagia na tumorigênese e na resposta à terapia anticâncer é complexo. Uma vez que a autofagia protege as células do estresse metabólico, sua regulação positiva poderia preservar a integridade genômica e, portanto, evitar a tumorigênese. Por outro lado, em neoplasias estabelecidas, as células poderiam utilizar a autofagia para sobreviver à limitação de nutrientes e hipóxia ou ativá-la como resposta ao estresse para sobreviver aos tratamentos antineoplásicos (GALLUZZI *et al.*, 2015; LI; HE; MA, 2020).

Nos últimos anos, a autofagia tem se apresentado como importante objeto de investigação no contexto das neoplasias de glândulas salivares, particularmente em CACs, com destaque para a expressão de proteínas relacionadas à via mTOR e LC3 (SUN *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2012; CROS *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2013; CLAUDITZ *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2014; HUANG *et al.* 2015; LIANG *et al.*, 2015; AHN *et al.*, 2017; OUYANG *et al.*, 2017b; SOARES *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019; GOULART-FILHO *et al.*, 2019). Em contrapartida, estudos que verifiquem a relação entre as expressões das proteínas associadas à autofagia de forma comparativa entre diferentes neoplasias de glândulas salivares são escassos (ETTL *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2012; CLAUDITZ *et al.*, 2013; CROS *et al.*, 2013; HUANG *et al.* 2015).

Ettl *et al.* (2012), em estudo com microarranjo tecidual (TMA), verificaram a expressão imunoistoquímica de p-mTOR em 272 carcinomas de glândulas salivares e relacionaram com parâmetros clinicopatológicos. Mais de 60% dos casos não apresentaram expressão de p-mTOR. Para os CACs (n = 38), CMEs (n = 40) e ACPs (n = 10), o percentual de casos com positividade nuclear foi de 21%, 15% e 0%, e positividade citoplasmática foi de 15%, 20% e 40%, respectivamente. Considerando-se os 272 casos de carcinomas de glândulas salivares analisados, foi constatada associação entre a ausência de expressão nuclear de p-mTOR e a presença metástases linfonodais. Na análise multivariada, a expressão nuclear ou citoplasmática/membranar de p-mTOR não mostrou associação estatisticamente significativa com os índices de sobrevida. A ausência de expressão citoplasmática/membranar de p-mTOR mostrou associação com os maiores tamanhos do tumor (T3-T4). Desse modo, Ettl *et al.* (2012) sugeriram que a expressão de p-mTOR se correlaciona com o comportamento menos agressivo dos carcinomas de glândulas salivares.

Outro estudo, realizado em 2012, analisou a imunoexpressão de p-Akt e p-mTOR, bem como do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), em 47 carcinomas de glândula salivar (SUZUKI *et al.*, 2012). A amostra continha apenas 7 CMEs e 5 CACs, dos quais 57% e 40% foram positivos para p-mTOR, respectivamente. De acordo com Suzuki *et al.* (2012), os componentes da via EGFR/HER2–Akt–mTOR se apresentam ativos nessas neoplasias e podem ser úteis no delineamento de estratégias de tratamento.

Uma análise da expressão de p-mTOR em TMA, com 205 adenomas e 994 carcinomas de glândulas salivares, foi realizada por Clauditz *et al.* (2013). Cerca de 48% dos APs (n = 48) foram negativos, 39% apresentaram marcação fraca e 12% marcação moderada de p-mTOR. Quando comparados aos outros 10 tipos de carcinomas analisados, os CMEs (n = 295)

revelaram maior expressão de p-mTOR, com 29% dos casos exibindo marcação fraca e 15% moderada. Nestas últimas lesões, os autores não constataram associação da expressão da proteína estudada com o grau histopatológico de malignidade. Assim, Clauditz *et al.* (2013) sugeriram que p-mTOR pode atuar na patogênese de neoplasias malignas de glândula salivar.

Resultados semelhantes foram encontrados por Cros *et al.* (2013). Os autores analisaram a expressão imunoistoquímica citoplasmática de mTOR em 107 casos de neoplasias malignas de glândula salivar e observaram positividade para esta proteína em apenas 17,8% dos casos. Mais especificamente, em CACs (n = 37) e CMEs (n = 24), esse percentual foi de 8,1% e 8,3%, respectivamente. Os maiores percentuais de positividade (38,5%) foram constatados para os carcinomas de células acinares (n = 14). Não foi observada associação entre a positividade para mTOR e a sobrevida geral e livre da doença. Desse modo, os autores sugeriram que inibidores de mTOR podem apresentar atividade antitumoral nos carcinomas de células acinares.

Um estudo realizado em 2017 associou a expressão de p-mTOR com a sobrevida e parâmetros clinicopatológicos em 120 casos de CACs de glândulas salivares (OUYANG *et al.*, 2017b). Observou-se associação estatisticamente significativa entre a baixa expressão nuclear de p-mTOR com o envolvimento linfonodal regional e entre a baixa expressão citoplasmática e nuclear da proteína com menor sobrevida geral e livre da doença. Concluiu-se, assim, que a alta expressão desse biomarcador estaria relacionada com melhor sobrevida e com um fenótipo menos agressivo da doença (OUYANG *et al.*, 2017b).

Embora em menor frequência, outras proteínas relacionadas à autofagia também têm sido alvo de estudos em tumores de glândula salivar. Nesse contexto, Jiang *et al.* (2012) investigaram a expressão das proteínas LC3 e Beclina-1 em 79 CACs de cabeça e pescoço. Houve expressão de LC3 em 57% dos casos e esta apresentou correlação com o envolvimento linfonodal e com o estágio clínico TNM mais avançado. A expressão de Beclina-1 ocorreu em 44,3% dos casos e apresentou correlação com os subtipos histológicos tubular e cribriforme, e com maior sobrevida. Em consonância com esses achados, Jiang *et al.* (2014) verificaram que a expressão de Beclina-1 foi estatisticamente correlacionada com o subtipo histológico tubular/cribriforme e com a sobrevida geral em uma amostra de 35 casos de CACs de cabeça e pescoço.

No estudo realizado por Huang *et al.* (2015) foi verificada uma maior imunoexpressão de LC3 em CACs (n = 74) quando comparados com APs (n = 12) e amostras de glândula salivar normal (n = 18), utilizando TMA. Não foi observada correlação entre a expressão de LC3 e o subtipo histológico da lesão. Assim, sugeriu-se que esta proteína pode ter um importante papel na patogênese dos CACs de glândulas salivares.

Soares *et al.* (2017), estudando a expressão de LC3B e Beclina-1 em 20 e 23 casos, respectivamente, de ACPs de glândulas salivares, encontraram positividade citoplasmática forte (mais de 50% das células positivas) em 43% dos casos para Beclina-1 e 85% dos casos para LC3B. De acordo com os autores, a autofagia pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos ACPs.

Mais recentemente, Li *et al.* (2019) reportaram imunexpressão de Beclina-1 e LC3 em todos os casos de uma amostra de 48 CACs de glândulas salivares. Os autores observaram maior expressão dessas proteínas no subtipo cribriforme quando comparado ao tubular/sólido e menor imunorreatividade nos casos em estágios clínicos mais avançados. Verificou-se, também, correlação positiva entre a expressão de LC3 e Beclina-1. De acordo com Li *et al.* (2019), LC3 e Beclina-1 podem ser importantes alvos terapêuticos para o tratamento do CAC.

Semelhantemente, Goulart-Filho *et al.* (2019) identificaram forte expressão de Beclina-1 e LC3B em 84% e 40% dos 25 casos de CAC de glândula salivar analisados, respectivamente. Contudo, não foram observadas diferenças nas imunexpressões de Beclina-1 e LC3B entre CACs sólidos e não sólidos. Assim, os autores sugeriram que autofagia pode desempenhar um papel importante na patogênese do CAC, bem como no desenvolvimento da resistência à quimioterapia.

Assim, os estudos anteriormente descritos apontam a possível participação de proteínas relacionadas à autofagia na patogênese de neoplasias de glândulas salivares. Porém, tais estudos focam, em sua maioria, em neoplasias malignas, especialmente o CAC, e na expressão de LC3 e proteínas da via mTOR. Esta última, na maioria desses trabalhos, é analisada no contexto de outros processos celulares e não da autofagia.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, por meio de imunistoquímica, a expressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e classificar os APs e CACs quanto ao subtipo histológico;
- Analisar e classificar os CMEs quanto ao grau histopatológico de malignidade;
- Determinar os percentuais de células imunopositivas para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR e compará-los entre os grupos de estudo (APs, ACPs, CMEs e CACs);
- Relacionar a imunexpressão das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR com o subtipo histológico nos APs e CACs;
- Relacionar a imunexpressão das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR com o grau histopatológico de malignidade nos CMEs;
- Estabelecer correlações entre as imunexpressões das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nos APs, ACPs, CMEs e CACs.

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

O presente estudo foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), respeitando a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde. O protocolo foi aprovado conforme parecer nº 3.155.854 (ANEXO A).

3.2 Caracterização do estudo

O estudo consistiu em uma pesquisa observacional analítica, caracterizada pelo registro e quantificação das imunorexpressões das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares.

3.3 População

A população do estudo foi constituída por todos os casos de APs, ACPs, CMEs e CACs diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/João Pessoa – PB e nos Laboratórios de Histopatologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)/ Fortaleza – CE e do Departamento de Odontologia da UEPB/ Campina Grande – PB.

3.4 Amostra

A amostra foi constituída por 20 casos de AP, 20 casos de ACP, 20 casos de CME e 14 casos de CAC, todos emblocados em parafina. Os referidos casos foram selecionados a partir da técnica de amostragem do tipo não probabilística, por conveniência.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas casos de AP, ACP, CME e CAC de glândula salivar, que apresentaram material biológico suficiente para realização dos estudos morfológicos e

imunoistoquímicos. Foram selecionados apenas os casos cujos blocos de parafina estavam em bom estado de conservação.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os casos de ACP, CME e CAC previamente submetidos à radioterapia.

3.5 Variáveis

As variáveis independentes e dependentes que foram analisadas no presente estudo estão listadas nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Neoplasia de glândula salivar	Classificação da lesão de acordo com suas características histopatológicas.	- AP - ACP - CME - CAC
Subtipo histológico dos APs	Classificação dos APs de acordo com quantidade de células e a composição do estroma (SOARES <i>et al.</i> , 2009).	- Rico em células - Pobre em células
Subtipo histológico dos CACs	Classificação dos CACs de acordo com o subtipo histopatológico (ELLIS; AUCLAIR, 2008).	- Cribriforme - Tubular - Sólido
Grau histopatológico de malignidade dos CMEs	Classificação dos CMEs de acordo com o grau histopatológico de malignidade (BRANDWEIN <i>et al.</i> 2001).	- Grau I - Grau II - Grau III

Quadro 3. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Atg7	Imunomarcção para Atg7 em células neoplásicas	- Percentual de células imunopositivas em citoplasma - Percentual de células imunopositivas em núcleo

LC3A	Imunomarcção para LC3A em células neoplásicas	- Percentual de células imunopositivas em citoplasma - Percentual de células imunopositivas em núcleo
p62	Imunomarcção para p62 em células neoplásicas	- Percentual de células imunopositivas em citoplasma - Percentual de células imunopositivas em núcleo
p-mTOR	Imunomarcção para p-mTOR em células neoplásicas	- Percentual de células imunopositivas em citoplasma - Percentual de células imunopositivas em núcleo

3.6 Estudo morfológico

Lâminas com cortes de 5µm de espessura do material previamente incluído em parafina foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina e analisadas à microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por um patologista oral experiente.

Baseando-se na metodologia utilizada no estudo de Soares *et al.* (2009), os APs foram classificados de acordo com a quantidade celular e a composição do estroma em: tumores ricos em células (predomínio de células epiteliais) e tumores pobres em células (predomínio de áreas mixoides e condroides). Os CMEs foram avaliados e classificados histologicamente em grau I, II ou III, de acordo com os parâmetros descritos por Brandwein *et al.* (2001).

Por sua vez, os CACs foram classificados de acordo com seguintes subtipos histopatológicos: cribriforme (lesões puramente cribriformes ou com < 30% de áreas sólidas), tubular (lesões com áreas tubulares e cribriformes, mas sem componente sólido) e sólido (lesões com predomínio do padrão sólido) (ELLIS; AUCLAIR, 2008).

3.7 Estudo imunoistoquímico

3.7.1 Método imunoistoquímico

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 preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da

imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe PlusTM*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), utilizando anticorpo policlonal anti-LC3A e anticorpos monoclonais anti-Atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR (QUADRO 4).

Como controle positivo foram utilizados cortes histológicos de granuloma periapical para os anticorpos anti-Atg7 e anti-LC3A, cortes de hiperplasia fibrosa inflamatória para anti-p62 e parênquima glandular salivar em espécimes de mucocele para o anti-p-mTOR. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo imunoistoquímico.

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

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);
- ⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 4);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*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 (*Amplifier*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (2 trocas);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP conjugate*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, 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 (*Liquid DAB+ substrate system*, 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 Mayer, à temperatura ambiente (8 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

Quadro 4. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Atg7	ab52472	Abcam	1:750	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	60 minutos
LC3A	#4599	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	60 minutos
p62	ab56416	Abcam	1:800	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:200	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>

3.7.2 Análise imunoistoquímica

A análise quantitativa das expressões das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) nos APs, ACPs, CMEs e CACs foi realizada adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Oyang *et al.* (2017). A análise da expressão das proteínas foi realizada, separadamente, em citoplasma e núcleo das células neoplásicas. Considerou-se como positividade a coloração acastanhada independentemente de sua intensidade.

As amostras foram analisadas por uma única observadora em microscópio óptico (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE). Sob aumento de 100×, foi identificada a área com maior imunorreatividade para as proteínas estudadas. Posteriormente, 5 campos microscópicos de maior imunorreatividade foram fotomicrografados (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sob aumento de 400×, e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa ImageJ® (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) foram contadas todas as células neoplásicas em cada campo selecionado. Em sequência, foi calculado o percentual de células exibindo positividade em relação ao total de células contadas.

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos com o estudo imunoistoquímico foram organizados em um banco de dados informatizado e analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Os dados provenientes da análise das imunoexpressões de Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram analisados por meio do teste de Shapiro-Wilk, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Desse modo, comparações entre as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos de lesões foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. De forma similar, possíveis diferenças nas imunoexpressões de Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR, em relação aos subtipos histopatológicos de APs e CACs e ao grau histopatológico de malignidade dos CMEs, foram analisadas por meio do teste de Mann-Whitney. As correlações entre as imunoexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de Spearman. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o 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 tese: **“Imunoexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em neoplasias de glândulas salivares”**.

O artigo será submetido ao periódico *Archives of Oral Biology* (ISSN: 0003-9969; Fator de impacto: 1.931; Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Imunoexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em neoplasias de glândulas salivares

Título breve: **Autofagia em neoplasias de glândula salivar**

Emanuene Galdino Pires¹, Maria Cássia Ferreira de Aguiar², Ricardo Alves de Mesquita², Manuel Antonio Gordón-Núñez¹, Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹

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

²*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.*

Autor correspondente:

Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

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

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

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

ABSTRACT

Objective: To evaluate the immunoexpression of autophagy-related proteins (Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR) in pleomorphic adenomas (PA), polymorphous adenocarcinomas (PAC), mucoepidermoid carcinomas (MEC) and adenoid cystic carcinomas (ACC) of salivary glands.

Design: Twenty PAs, 20 PACs, 20 MECs and 14 ACCs were selected for the study. The percentages of cytoplasmic and nuclear staining for Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR in neoplastic cells were assessed and correlated with histopathological parameters.

Results: Cytoplasmic expression of Atg7 was observed in all groups evaluated, with high median percentages of positivity. Regarding LC3A, cytoplasmic expression was found in most PACs (95%) and in all cases of PA, MEC and ACC. ACCs exhibited lower percentages of cytoplasmic expression for p-mTOR compared to PAs, PACs and MECs ($p < 0.005$). PAs presented the highest percentages of nuclear expression of p62, with statistically significant differences compared to PACs and ACCs ($p < 0.005$). Regarding nuclear expression of Atg7, LC3A and p-mTOR, all groups exhibited low median percentages of positivity. There were no significant differences in the immunoexpression of autophagy-related proteins according to histopathological parameters of PAs, MECs and ACCs. In PAs, MECs and ACCs, positive correlations were observed among the immunoexpressions of some autophagy-related proteins ($p < 0.05$).

Conclusions: The results suggest the potential involvement of autophagy in the pathogenesis of PA, PAC, MEC and ACC of salivary glands. The upregulation of autophagy and the reduced nuclear translocation of protein p62 may contribute to aggressive biological behavior of ACC of salivary glands.

Keywords: Salivary gland neoplasms; Autophagy; Autophagy-related proteins; Immunohistochemistry.

Introdução

Neoplasias de glândulas salivares são um complexo grupo de lesões que representam de 3% a 6% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço e são caracterizadas pela diversidade de características histopatológicas e comportamentos clínicos (Griffith, Schmitt, Little, & Magliocca, 2017; Da Silva *et al.*, 2018). Tal complexidade é atribuída a sua heterogeneidade histogenética associada à capacidade das suas células em diferenciar-se em vários subtipos morfológicos, os quais resultam em diversos padrões arquiteturais (Seethala, 2017).

O adenoma pleomórfico (AP), a neoplasia benigna mais frequente de glândulas salivares, se caracteriza pelo crescimento lento e de caráter expansivo (Da Silva *et al.*, 2018; Almeslet, 2020). A neoplasia maligna mais comum é o carcinoma mucoepidermoide (CME), caracterizado pela variabilidade em seu comportamento clínico. Outra neoplasia maligna de glândulas salivares com prevalência próxima à observada para o CME é o carcinoma adenoide cístico (CAC), o qual se destaca pelo potencial para desenvolver metástases à distância tardias (Da Silva *et al.*, 2018; He *et al.*, 2017). Por sua vez, o adenocarcinoma polimorfo (ACP) é uma neoplasia maligna quase que exclusiva de glândulas salivares menores, com baixo potencial metastático (Ellis, & Auclair, 2008; Fonseca, Bell, Gnepp, Sheetala, & Weinreb, 2017).

No contexto do desenvolvimento e progressão de neoplasias diversas, estudos têm destacado a participação da autofagia (Ettl *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; Sakakura *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2020). A autofagia é um mecanismo intracelular catabólico, no qual as células degradam seus próprios componentes citoplasmáticos dentro de vacúolos autofágicos que se fundem com lisossomos. Assim, regulam seu volume e utilizam os produtos derivados dessa degradação para sua sobrevivência (Gross, & Graef, 2020; Li, He, & Ma, 2020).

A autofagia se inicia com a formação de uma membrana de isolamento, denominada fagóforo. O subsequente alongamento e fechamento do fagóforo é mediado por uma série de proteínas relacionadas à autofagia (Atgs), especialmente por dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina: a Atg5-Atg12 e a cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3). Para a ligação entre Atg5 e Atg12 é necessária a atuação da Atg7, uma enzima semelhante à enzima ativadora de ubiquitina (E1) (Arakawa, Honda, Yamaguchi, & Shimizu, 2017; Li, He, & Ma, 2020). Os substratos da autofagia podem ser seletivamente direcionados para degradação por meio da interação entre LC3 e a proteína p62, também denominada sequestossomo-1 (SQSTM1). Esta última marca as moléculas citoplasmáticas a serem degradadas, por meio do seu domínio C-terminal associado à ubiquitina (UBA) (Schaaf, Keulers, Vooijs, & Rouschop, 2016; Li, He, & Ma, 2020).

Ainda no contexto da autofagia, destaca-se o papel da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que funciona como um sensor de nutrientes. A proteína mTOR fosforilada (p-mTOR) inibe a função das proteínas Atg13, Atg101, FIP200 e quinase 1 semelhante a Unc-51 (UKL1). Esses componentes, juntamente com o complexo da Beclina-1, são essenciais para o alongamento do fagóforo (Li, He, & Ma, 2020; Gross, & Graef, 2020).

No que se refere às neoplasias de glândulas salivares, investigações sobre a expressão de proteínas relacionadas à autofagia sugerem um potencial envolvimento desse processo na patogênese dessas lesões (Ettl *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012; Clauditz *et al.*, 2013; Cros *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Huang, Deng, Zhang, Zhang, & Sun, 2015; Soares *et al.*, 2017; Ouyang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Goulart-Filho, Montalli, Passador-Santos, de Araújo, & de Araújo, 2019). Além disso, estudos sugerem uma possível associação da expressão de proteínas relacionadas à autofagia, em neoplasias de glândulas salivares, com maior tamanho da lesão (Ettl *et al.*, 2012), envolvimento linfonodal regional, estágios clínicos avançados (Jiang *et al.*, 2012) e características histopatológicas (Jiang *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014).

No entanto, muitos dos estudos em neoplasias de glândulas salivares são direcionados apenas às malignas, especialmente o CAC. Além disso, essas pesquisas analisaram um pequeno número de proteínas relacionadas à autofagia, com destaque para LC3 e mTOR. Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a imunoexpressão de quatro importantes proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em quatro diferentes tipos de neoplasias de glândulas salivares que possuem características histológicas e comportamentos biológicos distintos (APs, ACPs, CMEs e CACs).

Materiais e métodos

Amostra

A amostra foi constituída por 20 casos de AP, 20 casos de ACP, 20 casos de CME e 14 casos de CAC diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/João Pessoa – PB e nos Laboratórios de Histopatologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)/ Fortaleza – CE e do Departamento de Odontologia da UEPB/ Campina Grande – PB. Foram incluídos na amostra, apenas casos de AP, ACP, CME e CAC de glândula salivar, que apresentaram material biológico suficiente para realização dos estudos morfológicos e imunoistoquímicos. Especificamente para os CACs, CMEs e ACPs, foram excluídos do estudo os casos submetidos previamente à radioterapia. O estudo foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB, Campina Grande, Brasil (Parecer nº 3.155.854).

Análise morfológica

A partir do material embocado em parafina, cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos, estendidos em lâminas de vidro e posteriormente corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina. Em sequência, um patologista oral experiente realizou as análises morfológicas sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE).

Os APs foram classificados, de acordo com a quantidade celular e a composição do estroma, em: tumores ricos em células (predomínio de células epiteliais) e tumores pobres em células (predomínio de áreas mixoides e condroides) (Soares, De Araújo, Juliano, & Altemani, 2009). Com base nos parâmetros descritos por Brandwein *et al.* (2001), os CMEs foram avaliados e classificados, quanto ao grau histopatológico de malignidade, em: grau I, grau II e grau III. Por sua vez, os CACs foram classificados de acordo com seguintes subtipos histopatológicos: cribriforme (lesões puramente cribriformes ou com < 30% de áreas sólidas), tubular (lesões com áreas tubulares e cribriformes, mas sem componente sólido) e sólido (lesões com predomínio do padrão sólido) (Ellis, & Auclair, 2008).

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 preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Tabela 1). Em sequência, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após incubação com anticorpos primários anti-Atg7, anti-LC3A, anti-p62 e anti-p-mTOR (Tabela 1), os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe PlusTM*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada por meio da imersão dos cortes em diaminobenzidina (*Liquid DAB+ substrate system*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com lamínula.

Como controle positivo foram utilizados cortes histológicos de granuloma periapical, para os anticorpos anti-Atg7 e anti-LC3A, e de hiperplasia fibrosa inflamatória, para o anticorpo anti-p62. Parênquima glandular salivar, presente em espécimes de mucocele, foi utilizado como controle positivo para o anticorpo anti-p-mTOR. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo imunoistoquímico.

Análise imunoistoquímica

A imunoexpressão das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) nos APs, ACPs, CMEs e CACs foi avaliada, de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Ouyang *et al.* (2017). A análise da expressão das proteínas foi realizada, separadamente, em citoplasma e núcleo das células neoplásicas. Considerou-se como positividade a coloração acastanhada independentemente de sua intensidade.

Os cortes teciduais foram analisados, por uma única observadora, sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE). Sob aumento de 100×, foi identificada a área com maior imunorreatividade para as proteínas estudadas. Posteriormente, sob aumento de 400×, cinco campos microscópicos de maior imunorreatividade foram fotomicrografados (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa ImageJ® (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA), foram contadas todas as células neoplásicas em cada campo selecionado. Posteriormente, foi calculado o percentual de células exibindo positividade em relação ao total de células contadas.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Os dados provenientes da análise das imunoexpressões de Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram avaliados por meio do teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos lesões e às características histopatológicas de APs, CMEs e CACs. Possíveis correlações entre as imunoexpressões das proteínas relacionadas à autofagia foram avaliadas por meio do teste de Spearman. Devido aos baixos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A e p-mTOR em núcleo, os dados referentes à expressão dessas proteínas foram analisados apenas por meio de estatística

descritiva. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Análise morfológica

A análise das características histopatológicas dos APs revelou 12 casos do subtipo histológico rico em células e 8 do subtipo pobre em células. No grupo dos CMEs, a avaliação do grau histopatológico de malignidade demonstrou nove casos com grau I, nove casos com grau II e dois casos com grau III. Em relação ao subtipo histológico dos CACs, observou-se 6 casos do subtipo cribriforme, 6 do subtipo tubular e 2 do subtipo sólido.

Imunoexpressão de Atg7

Expressão citoplasmática de Atg7 foi constatada em todos os casos analisados, com altos percentuais de positividade em todos os grupos (**Figuras 1A – D**). Os CACs apresentaram os menores percentuais de imunopositividade citoplasmática e os ACPs os maiores, quando comparados aos demais grupos de lesões ($p < 0,05$) (**Tabela 2; Figura 2A**). A análise da expressão nuclear de Atg7 revelou maior percentual de casos positivos nos ACPs (95%), seguidos dos APs (85%), CACs (50%) e CMEs (45%). Em todos os grupos analisados, foram constatados baixos percentuais de células imunopositivas para Atg7 em núcleo (**Tabela 2; Figura 2B**).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão citoplasmática de Atg7 em relação ao subtipo histológico dos APs e CACs e ao grau histopatológico de malignidade dos CMEs (**Figuras 3A – C**).

Imunoexpressão de LC3A

Expressão citoplasmática de LC3A foi identificada em todos os casos de AP, CME e CAC e em 95% dos ACPs analisados (**Figuras 4A – D**). Os CACs apresentaram os menores percentuais de imunopositividade citoplasmática e os ACPs os maiores, quando comparados aos demais grupos de lesões ($p < 0,05$) (**Tabela 2; Figura 2A**). APs, ACPs e CMEs apresentaram expressão nuclear em 15%, 15% e 10% dos casos, respectivamente. Os CACs não demonstraram marcação nuclear para LC3A (**Tabela 2; Figura 2B**).

Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão citoplasmática de LC3A em relação ao subtipo histológico dos APs e CACs e ao grau histopatológico de malignidade dos CMEs (**Figuras 3A – C**).

Imunoexpressão de p62

Expressão citoplasmática de p62 foi constatada em todos os casos analisados (**Figuras 5A – D**). Foram observados maiores percentuais de imunopositividade citoplasmática nos CMEs e ACPs, com diferença estatisticamente significativa quando comparados aos APs e CACs ($p < 0,05$) (**Tabela 2; Figura 2A**). APs e ACPs apresentaram expressão nuclear em todos os casos e CMEs e CACs em 90% e 85% dos casos, respectivamente. Os maiores percentuais de expressão nuclear de p62 foram observados nos APs, com diferença estatisticamente significativa quando comparados aos ACPs e CACs ($p < 0,005$) (**Tabela 2; Figura 2B**).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão citoplasmática e nuclear de p62 em relação ao subtipo histológico dos APs e CACs e ao grau histopatológico de malignidade dos CMEs (**Figuras 3A – C e Figuras 6A – C**).

Imunoexpressão de p-mTOR

Expressão citoplasmática de p-mTOR foi constatada em todos os casos analisados (**Figuras 7A – D**). Os CACs apresentaram os menores percentuais de imunopositividade citoplasmática, quando comparados aos demais grupos de lesões ($p < 0,005$) (**Tabela 2; Figura 2A**). APs, ACPs e CMEs apresentaram expressão nuclear em 50%, 30% e 35% dos casos, respectivamente. Os CACs não apresentaram marcação nuclear para p-mTOR (**Tabela 2; Figura 2B**).

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão citoplasmática de p-mTOR em relação ao subtipo histológico dos APs e CACs e ao grau histopatológico de malignidade dos CMEs (**Figuras 3A – C**).

Correlação entre as imunoexpressões de Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR

Nos CACs foi observada correlação positiva entre as expressões citoplasmáticas de: Atg7 e p62 ($r = 0,852$; $p < 0,0001$), Atg7 e LC3A ($r = 0,710$; $p = 0,004$), LC3A e p-mTOR ($r = 0,569$; $p = 0,034$) e LC3A e p62 ($r = 0,577$; $p = 0,039$). Correlação positiva entre a expressão citoplasmática de LC3A e p62 também foi constatada nos APs ($r = 0,577$; $p = 0,008$). Nos CMEs foi observada correlação positiva entre as expressões citoplasmáticas de Atg7 e p62 ($r = 0,0553$; $p = 0,011$).

Discussão

A autofagia constitui um mecanismo de sobrevivência celular, que permite a regulação do volume e a renovação da célula. Em condições patológicas, como oxidação lipídica e estresse

metabólico e oxidativo, esse processo torna-se notadamente ativo (Gross, & Graef, 2020; Li, He, & Ma, 2020). O papel da autofagia na tumorigênese é complexo. Sugere-se que em neoplasias estabelecidas, as células podem utilizar a autofagia para sobreviver à limitação de nutrientes e hipóxia (Galluzzi *et al.*, 2015; Li, He, & Ma, 2020), mas a sua participação no desenvolvimento das neoplasias de glândulas salivares ainda não é completamente compreendida.

No presente estudo, foi constatada imunoposição citoplasmática das proteínas Atg7, LC3A e p62 em APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares. Em particular, as proteínas Atg7, envolvida na formação e alongamento do autofagossomo, e p62, responsável por sinalizar as moléculas citoplasmáticas a serem degradadas (Xiong, 2015; Schaaf, Keulers, Vooijs, & Rouschop, 2016), apresentaram altos percentuais de imunopositividade em todos os grupos analisados. Além disso, nos quatro tipos de neoplasias avaliadas, os níveis de expressão citoplasmática de p-mTOR, um importante inibidor da autofagia (Li, He, & Ma, 2020; Gross, & Graef, 2020), foram inferiores aos observados para Atg7 e p62. Em conjunto, tais resultados sugerem o envolvimento da autofagia na patogênese de APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares.

Em comparação aos demais grupos de neoplasias, os CACs apresentaram menores percentuais de imunoposição citoplasmática de p-mTOR ($p < 0,05$). Resultados similares foram reportados por Ettl *et al.* (2012). Em estudo com 272 carcinomas de glândulas salivares, esses autores observaram ausência de imunoposição de p-mTOR em mais de 60% dos casos. Para CACs ($n = 38$), CMEs ($n = 40$) e ACPs ($n = 10$), o percentual de células com positividade citoplasmática foi de 15%, 20% e 40%, respectivamente. Além disso, Ettl *et al.* (2012) observaram associação entre menor expressão citoplasmática de p-mTOR e maiores tamanhos do tumor (T3-T4), sugerindo que a ativação da autofagia pode contribuir para um comportamento biológico mais agressivo de carcinomas de glândulas salivares. Em conjunto, os achados anteriormente descritos e os resultados da presente pesquisa sugerem que as diferenças no comportamento biológico de APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares podem estar relacionadas a diferentes níveis de ativação da autofagia nessas lesões. Em especial, a regulação positiva da autofagia poderia contribuir para o comportamento biológico agressivo do CAC de glândulas salivares.

Além desse possível envolvimento da autofagia no comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares, pode-se ponderar uma eventual relação deste processo com a composição celular e o grau de diferenciação de células epiteliais e mioepiteliais nestas lesões. Em consonância com essa sugestão, estudos revelam que carcinomas de glândulas salivares

com diferenciação mioepitelial, como o CAC, apresentam menores densidades microvasculares quando comparados a carcinomas sem diferenciação mioepitelial, como o CME (Costa, Demasi, Bonfitto, Bonfitto, Furuse C, & Araújo VC, 2008; Dezfuli, Seyedmajidi, Nafarzadeh, Yazdani, & Bijani, 2019). De acordo com Goulart-Filho *et al.* (2019), a autofagia pode desempenhar um papel mais importante no desenvolvimento dos CACs do que um aumento do suporte vascular.

No presente estudo, foram observados resultados peculiares em relação à imunoposição de LC3A, uma proteína envolvida na formação do autofagossomo (Schaaf, Keulers, Vooijs, & Rouschop, 2016). Os maiores percentuais de expressão citoplasmática de LC3A foram observados nos APs e ACPs. Por outro lado, CMEs e CACs apresentaram menores percentuais de imunopositividade para essa proteína. Esses achados sugerem eventuais diferenças na composição dos autofagossomos entre essas neoplasias de glândulas salivares.

Há 3 subtipos de LC3 (LC3A, LC3B e LC3C), cujas funções individuais na autofagia não são, ainda, totalmente conhecidas (Schaaf, Keulers, Vooijs, & Rouschop, 2016). Por meio da sua ligação com proteínas presentes na membrana externa das mitocôndrias, com destaque para FKBP8 e FUNDC1, LC3A pode desempenhar importante papel na autofagia dessas organelas (Montava-Garriga, & Ganley, 2020). Nesse contexto, neoplasias de glândulas salivares constituídas predominantemente por células que apresentam maiores quantidades de mitocôndrias poderiam expressar maiores níveis de LC3A.

Estudos demonstraram que, em glândulas salivares normais e neoplasias de glândulas salivares, células ductais apresentam maior quantidade de mitocôndrias quando comparadas às células mioepiteliais (Chaudhry *et al.*, 1987; Chitturi, Veeravarmal, Nirmal, & Reddy, 2015). Desse modo, as baixas expressões de LC3A em CACs e CMEs, verificadas na presente pesquisa, podem estar relacionadas ao subtipo celular predominante nas lesões. Em contrapartida, no estudo realizado por Huang, Deng, Zhang, Zhang, & Sun (2015) foi verificada uma maior imunoposição de LC3 em CACs (n = 74) quando comparados com APs (n = 12). Assim, os autores sugeriram que essa proteína pode ter um importante papel na patogênese dos CACs de glândulas salivares. Em conjunto, esses achados destacam a importância de investigações posteriores sobre a expressão das diferentes isoformas de LC3 em neoplasias de glândulas salivares.

A expressão das proteínas relacionadas à autofagia ocorre particularmente no citoplasma. Eventualmente, podem apresentar expressão em núcleo, indicando a possível degradação de materiais neste compartimento celular, processo denominado de nucleofagia (Luo, Zhao, Song, Cheng, & Zhou, 2016). De acordo com os resultados deste estudo, sugere-

se que a nucleofagia não parece ter uma atuação significativa na patogênese das neoplasias de glândulas salivares avaliadas.

Na presente pesquisa, os APs apresentaram uma maior expressão nuclear de p62, com diferença estatisticamente significativa quando comparados aos ACPs e CACs, com estes últimos apresentando os menores percentuais. A p62 transita entre o núcleo e o citoplasma de forma rápida e constante, com distribuição preferencial no citoplasma. No núcleo, a p62 contribui para o recrutamento de proteínas nucleares poliubiquitinadas para degradação proteassomal (Havaki *et al.*, 2017). A p62 em núcleo também foi encontrada em associação com fatores de transcrição, como TFIIE e TFIIH, sugerindo um possível papel na regulação transcricional. Embora o papel preciso da p62 no núcleo não seja ainda completamente esclarecido, estudos sugerem que esta localização parece estar relacionada com uma função antitumoral (Emanuele *et al.*, 2020). Nesse contexto, Liu *et al.* (2014), analisando 195 carcinomas de células escamosas orais, verificaram que o baixo percentual nuclear de p62 foi associado a características clinicopatológicas de maior agressividade e ao prognóstico desfavorável.

Pesquisas sugerem que os perfis de expressão de proteínas em neoplasias de glândulas salivares podem estar relacionados à composição celular e ao grau de diferenciação de células epiteliais e mioepiteliais nestas lesões (Cavalcante, Nonaka, Rabenhorst, Miguel, Pinto, & Souza, 2017). Além disso, estudos destacam a associação das características morfológicas de algumas neoplasias de glândulas salivares com o prognóstico (He *et al.*, 2017; Granic, Sutton, Mueller, Cvriljevic, & Luksic, 2018). Porém, no presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas imunoexpressões de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em relação ao subtipo histológico dos CACs e APs e ao grau histopatológico de malignidade nos CMEs.

Apesar dos importantes achados da presente pesquisa, algumas limitações devem ser consideradas. Uma limitação é a ausência dos dados referentes ao estadiamento clínico dos ACPs, CMEs e CACs, bem como à sobrevida dos pacientes. O tamanho da amostra relativamente pequeno, especialmente nos CACs, também representa um fator de limitação neste estudo. Essas observações destacam a necessidade de outras pesquisas que avaliem a ativação da autofagia relacionada aos parâmetros clínicos e à progressão de neoplasias de glândulas salivares.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem uma potencial participação da autofagia na patogênese de APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares. A regulação positiva da autofagia e a translocação nuclear reduzida da proteína p62 podem contribuir para

o comportamento biológico agressivo do CAC de glândulas salivares. Os resultados aqui obtidos destacam a importância de novas investigações sobre o tema, que possam contribuir para a melhor compreensão do comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares e para a elaboração de novas estratégias terapêuticas.

Agradecimentos

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

Conflito de interesses

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesses.

Referências

Almeslet, A. S. (2020). Pleomorphic adenoma: a systematic review. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 13(3), 284-287. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1776.

Arakawa, S., Honda, S., Yamaguchi, H., & Shimizu, S. (2017). Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 93(6), 378-385. doi: 10.2183/pjab.93.023.

Brandwein, M. S., Ivanov, K., Wallace, D. I., Hille, J. J., Wang, B., Fahmy, A., ... & Lumerman, H. (2001). Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(7), 835-845. doi: 10.1097/00000478-200107000-00001.

Cavalcante, R. B., Nonaka, C. F., Rabenhorst, S. H., da Costa Miguel, M. C., Pinto, L. P., & de Souza, L. B. (2017). Pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of salivary glands: E-cadherin immunoexpression and analysis of the CDH1 -160C/A polymorphism. *Archives of Oral Biology*, 73, 48-54. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.09.005.

Chaudhry, A. P., Cutler, L. S., Yamane, G. M., Labay, G. R., Sunderraj, M., & Manak Jr, J. R. (1987). Ultrastructure of normal human parotid gland with special emphasis on myoepithelial distribution. *Journal of Anatomy*, 152, 1-11. PMID: 2820911; PMCID: PMC1261741.

- Chitturi, R. T., Veeravarmal, V., Nirmal, R. M., & Reddy, B. V. R. (2015). Myoepithelial cells (MEC) of the salivary glands in health and tumours. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(3), ZE14. doi: 10.7860/JCDR/2015/11372.5707.
- Clauditz, T. S., Gontarewicz, A., Bokemeyer, C., Sauter, G., Knecht, R., Münscher, A., & Wilczak, W. (2013). Abundant expression of m TOR kinase in salivary gland tumors—potentials as therapy target? *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42(10), 769-773. doi: 10.1111/jop.12064.
- Costa, A. F., Demasi, A. P., Bonfitto, V. L., Bonfitto, J. F., Furuse, C., Araújo, V. C., ... & Altemani, A. (2008). Angiogenesis in salivary carcinomas with and without myoepithelial differentiation. *Virchows Archiv*, 453(4), 359-367. doi: 10.1007/s00428-008-0664-z.
- Cros, J., Sbidian, E., Hans, S., Roussel, H., Scotté, F., Tartour, E., ... & Badoual, C. (2013). Expression and mutational status of treatment-relevant targets and key oncogenes in 123 malignant salivary gland tumours. *Annals of Oncology*, 24(10), 2624-2629. doi: 10.1093/annonc/mdt338.
- Da Silva, L. P., Serpa, M. S., Viveiros, S. K., Sena, D. A. C., de Carvalho Pinho, R. F., de Abreu Guimarães, L. D., ... & de Sousa, S. C. O. M. (2018). Salivary gland tumors in a Brazilian population: a 20-year retrospective and multicentric study of 2292 cases. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(12), 2227-2233. doi: 10.1016/j.jcms.2018.09.028.
- Dezfuli, M. K., Seyedmajidi, M., Nafarzadeh, S., Yazdani, F., & Bijani, A. (2019). Angiogenesis and lymphangiogenesis in salivary gland adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(12), 3547-3553. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.12.3547.
- Ellis, G. L., & Auclair, P. L. (2008). Tumors of the salivary glands, AFIP Atlas of Tumor Pathology Series 4. *American Registry of Pathology*, 27-48.
- Emanuele, S., Lauricella, M., D'Anneo, A., Carlisi, D., De Blasio, A., Di Liberto, D., & Giuliano, M. (2020). p62: Friend or foe? Evidences for oncoJanus and neuroJanus roles. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5029.

Ettl, T., Schwarz-Furlan, S., Haubner, F., Müller, S., Zenk, J., Gosau, M., ... & Zeitler, K. (2012). The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localisation. *Oral Oncology*, 48(9), 822-830. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.021.

Fonseca, I., Bell D., Gnepp, D. R., Sheetala R., & Weinreb I. (2017). Polymorphous adenocarcinoma. *WHO Classification of Head and Neck Tumours. International Agency for Research on Cancer*. Lyon, France, 167-168.

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., ... & Kimmelman, A. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*, 34(7), 856-880. doi: 10.15252/embj.201490784.

Goulart-Filho, J. A. V., Montalli, V. A. M., Passador-Santos, F., de Araújo, N. S., & de Araújo, V. C. (2019). Role of apoptotic, autophagic and senescence pathways in minor salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Diagnostic Pathology*, 14(1), 14-19. doi: 10.1186/s13000-019-0796-2.

Granic, M., Suton, P., Mueller, D., Cvrljevic, I., & Luksic, I. (2018). Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma: experience at a single institution based on 64 consecutive patients over a 28-year period. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 47(3), 283-288. doi: 10.1016/j.ijom.2017.09.005.

Griffith, C. C., Schmitt, A. C., Little, J. L., & Magliocca, K. R. (2017). New developments in salivary gland pathology: clinically useful ancillary testing and new potentially targetable molecular alterations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(3), 381-395. doi: 10.5858/arpa.2016-0259-SA.

Gross, A. S., & Graef, M. (2020). Mechanisms of autophagy in metabolic stress response. *Journal of Molecular Biology*, 432(1), 28-52. doi: 10.1016/j.jmb.2019.09.005.

Havaki, S., Vlachou, V., Zampetidis, C. P., Selemenakis, P., Kotsinas, A., Mavrogonatou, E., ... Gorgoulis, V.G. (2017). Monitoring autophagy immunohistochemically and ultrastructurally

during human head and neck carcinogenesis. Relationship with the DNA damage response pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1920-1936. doi: 10.3390/ijms18091920.

He, S., Li, P., Zhong, Q., Hou, L., Yu, Z., Huang, Z., & Chen, X. (2017). Clinicopathologic and prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of head and neck minor salivary glands: a clinical analysis of 130 cases. *American journal of otolaryngology*, 38(2), 157-162. doi: 10.1016/j.amjoto.2016.11.014.

Hou, C., Cai, H., Zhu, Y., Huang, S., Song, F., & Hou, J. (2020). Development and validation of autophagy-related gene signature and nomogram for predicting survival in oral squamous cell carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 10, 558596-558610. doi: 10.3389/fonc.2020.558596.

Huang, C. F., Deng, W. W., Zhang, L., Zhang, W. F., & Sun, Z. J. (2015). Expression of LC3, LAMP2, KEAP1 and NRF2 in salivary adenoid cystic carcinoma. *Pathology & Oncology Research*, 22(1), 109-114. doi: 10.1007/s12253-015-9981-0.

Jiang, L., Huang, S., Li, W., Zhang, D., Zhang, S., Zhang, W., . & Chen, Z. (2012). Expression of autophagy and ER stress-related proteins in primary salivary adenoid cystic carcinoma. *Pathology-Research and Practice*, 208(11), 635-641.

Jiang, L. C., Huang, S. Y., Zhang, D. S., Zhang, S. H., Li, W. G., Zheng, P. H., & Chen, Z. W. (2014). Expression of beclin 1 in primary salivary adenoid cystic carcinoma and its relation to Bcl-2 and p53 and prognosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(3), 252-258. doi: 10.1590/1414-431X20133231.

Li, C., Chen, Q., Tian, Z., Li, S., Gong, Z., Lin, Z. & Liu, H. (2019). Expression of MIF, Beclin1, and LC3 in human salivary gland adenoid cystic carcinoma and its prognostic value. *Medicine*, 98(20), e15402. doi: 10.1097/MD.00000000000015402.

Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*, 19(1), 12-27. doi: 10.1080/15548627.2017.1343770.

Liu, J. L., Chen, F. F., Lung, J., Lo, C. H., Lee, F. H., Lu, Y. C., & Hung, C. H. (2014). Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, *111*(5), 944-954.

Luo, M., Zhao, X., Song, Y., Cheng, H., & Zhou, R. (2016). Nuclear autophagy: an evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. *Autophagy*, *12*(11), 1973-1983. doi: 10.1080/15548627.2016.1217381.

Montava-Garriga, L., & Ganley, I. G. (2020). Outstanding questions in mitophagy: what we do and do not know. *Journal of Molecular Biology*, *432*(1), 206-230. doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.032.

Ouyang, D. Q., Liang, L. Z., Ke, Z. F., Zheng, G. S., Weng, D. S., Yang, W. F., ... & Liao, G. Q. (2017). Association between high expression of phosphorylated Akt and mammalian target of rapamycin and improved survival in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Head & Neck*, *39*(6), 1145-1154. doi: 10.1002/hed.24732.

Sakakura, K., Takahashi, H., Kaira, K., Toyoda, M., Oyama, T., & Chikamatsu, K. (2015). Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, *106*(1), 1-8. doi: 10.1111/cas.12559.

Schaaf, M. B., Keulers, T. G., Vooijs, M. A., & Rouschop, K. M. (2016). LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un) related functions. *The FASEB Journal*, *30*(12), 3961-3978. doi: 10.1096/fj.201600698R.

Seethala, R. R. (2017). Salivary gland tumors: current concepts and controversies. *Surgical Pathology Clinics*, *10*(1), 155-176. doi: 10.1016/j.path.2016.11.004.

Suzuki, S., Dobashi, Y., Minato, H., Tajiri, R., Yoshizaki, T., & Ooi, A. (2012). EGFR and HER2–Akt–mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. *Virchows Archiv*, *461*(3), 271-282. doi: 10.1007/s00428-012-1282-3.

Soares, A. B., De Araújo, V. C., Juliano, P. B., & Altemani, A. (2009). Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 38(8), 623-629. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00794.x.

Soares, A. B., Martinez, E. F., Ribeiro, P. F. A., Barreto, I. S., Aguiar, M. C., Furuse, C., ... & de Araújo, V. C. (2017). Factors that may influence polymorphous low-grade adenocarcinoma growth. *Virchows Archiv*, 470(4), 437-443. doi: 10.1007/s00428-017-2085-3.

Xiong, J. (2015). Atg7 in development and disease: panacea or Pandora's Box?. *Protein & Cell*, 6(10), 722-734. doi: 10.1007/s13238-015-0195-8.

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

<i>Especificidade</i>	<i>Referência</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Incubação</i>
Atg7	ab52472	Abcam	1:750	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	60 minutos
LC3A	#4599	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 60 min	60 minutos
p62	ab56416	Abcam	1:800	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:200	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight

Tabela 2. Tamanho da amostra, número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (núcleo e citoplasma) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de lesões.

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Nº de casos positivos (%)</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>Atg7 (citoplasma)</i>					
AP	20	20 (100)	98,59	40,88	99,81
ACP	20	20 (100)	99,86	85,16	100,00
CME	20	20 (100)	99,08	76,86	100,00
CAC	14	14 (100)	89,33	15,55	99,32
<i>Atg7 (núcleo)</i>					
AP	20	17 (85)	0,16	0,00	1,36
ACP	20	19 (95)	0,14	0,00	0,53
CME	20	9 (45)	0,00	0,00	0,98
CAC	14	7 (50)	0,02	0,00	0,33
<i>LC3A (citoplasma)</i>					
AP	20	20 (100)	51,82	3,56	79,52
ACP	20	19 (95)	77,56	0,00	96,93
CME	20	20 (100)	14,79	1,83	62,4
CAC	14	14 (100)	5,77	1,07	28,6
<i>LC3A (núcleo)</i>					
AP	20	3 (15)	0,00	0,00	0,84
ACP	20	3 (15)	0,00	0,00	0,10
CME	20	2 (10)	0,00	0,00	2,82
CAC	14	0 (0)	0,00	0,00	0,00
<i>p62 (citoplasma)</i>					
AP	20	20 (100)	89,40	28,95	100,00
ACP	20	20 (100)	95,62	86,3	99,71
CME	20	20 (100)	96,71	52,72	99,94
CAC	14	14 (100)	78,83	20,6	98,71
<i>p62 (núcleo)</i>					
AP	20	20 (100)	20,95	2,49	55,36
ACP	20	20 (100)	8,89	0,06	30,85
CME	20	18 (90)	13,30	0,00	50,13
CAC	14	12 (85,7)	2,30	0,00	24,69
<i>p-mTOR (citoplasma)</i>					
AP	20	20 (100)	47,10	10,75	79,66
ACP	20	20 (100)	63,97	11,16	96,17
CME	20	20 (100)	57,82	3,65	85,84
CAC	14	14 (100)	10,06	1,69	55,58
<i>p-mTOR (núcleo)</i>					
AP	20	10 (50)	0,02	0,00	20,86
ACP	20	6 (30)	0,00	0,00	1,52
CME	20	7 (35)	0,00	0,00	19,06
CAC	14	0 (0)	0,00	0,00	0,00

Figura 1. Imunoexpressão de Atg7 em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus™, 200×).

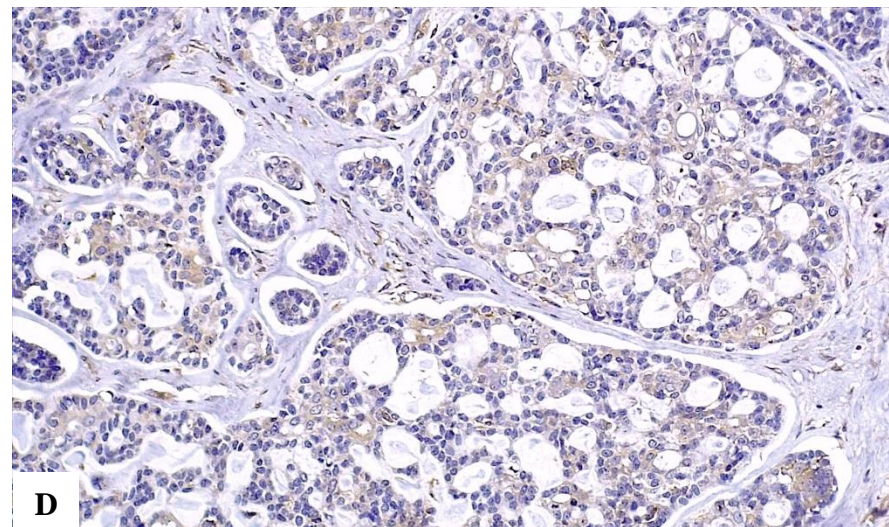
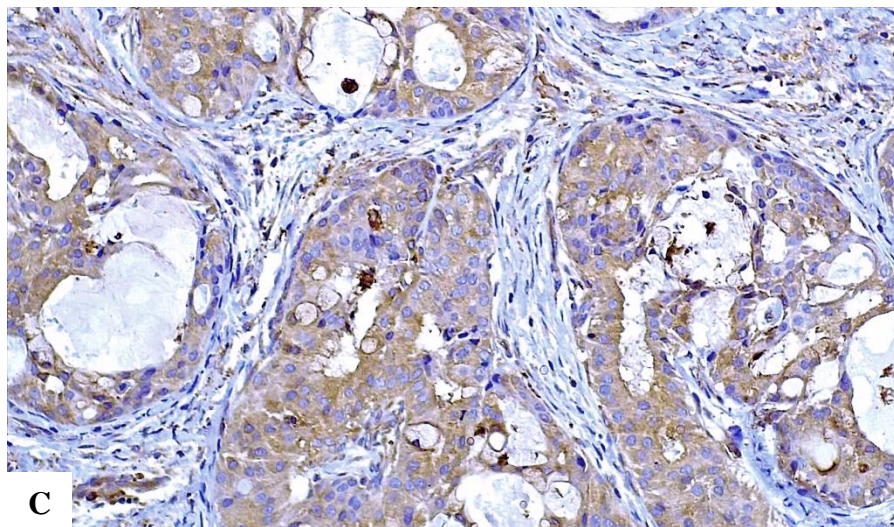
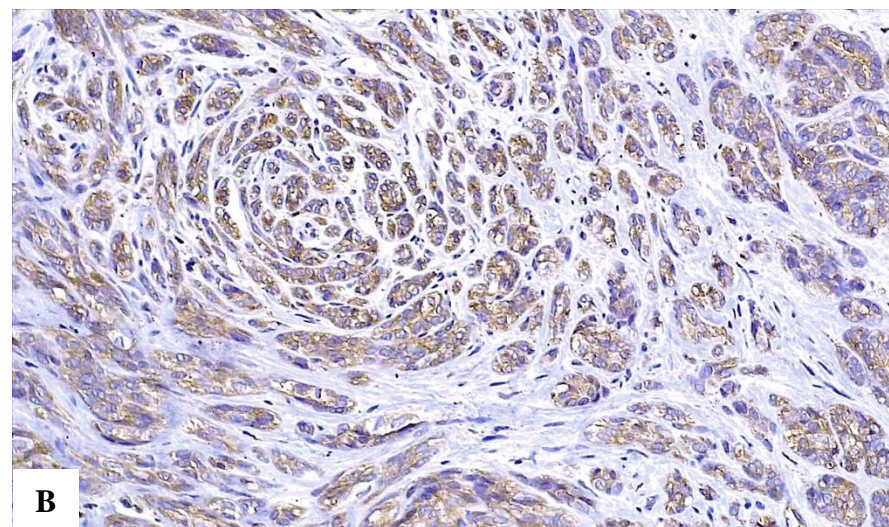
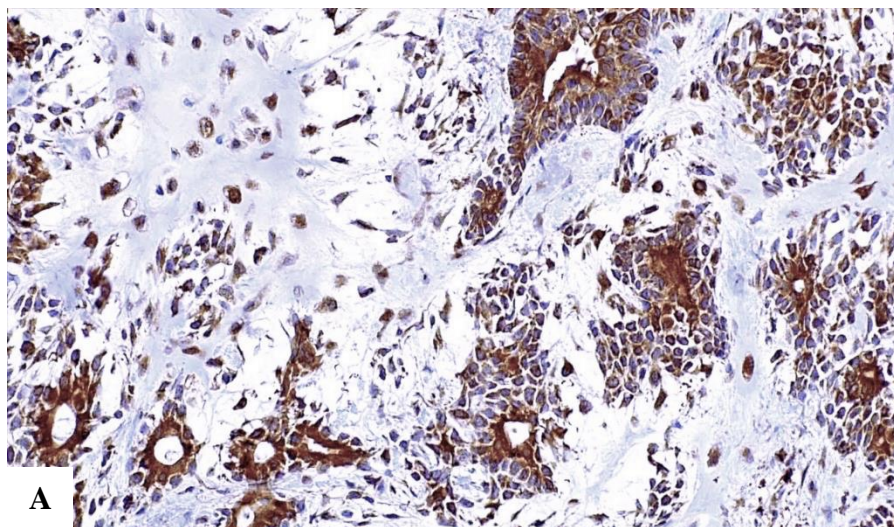


Figura 2. Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade em citoplasma (A) e núcleo (B) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de lesões.

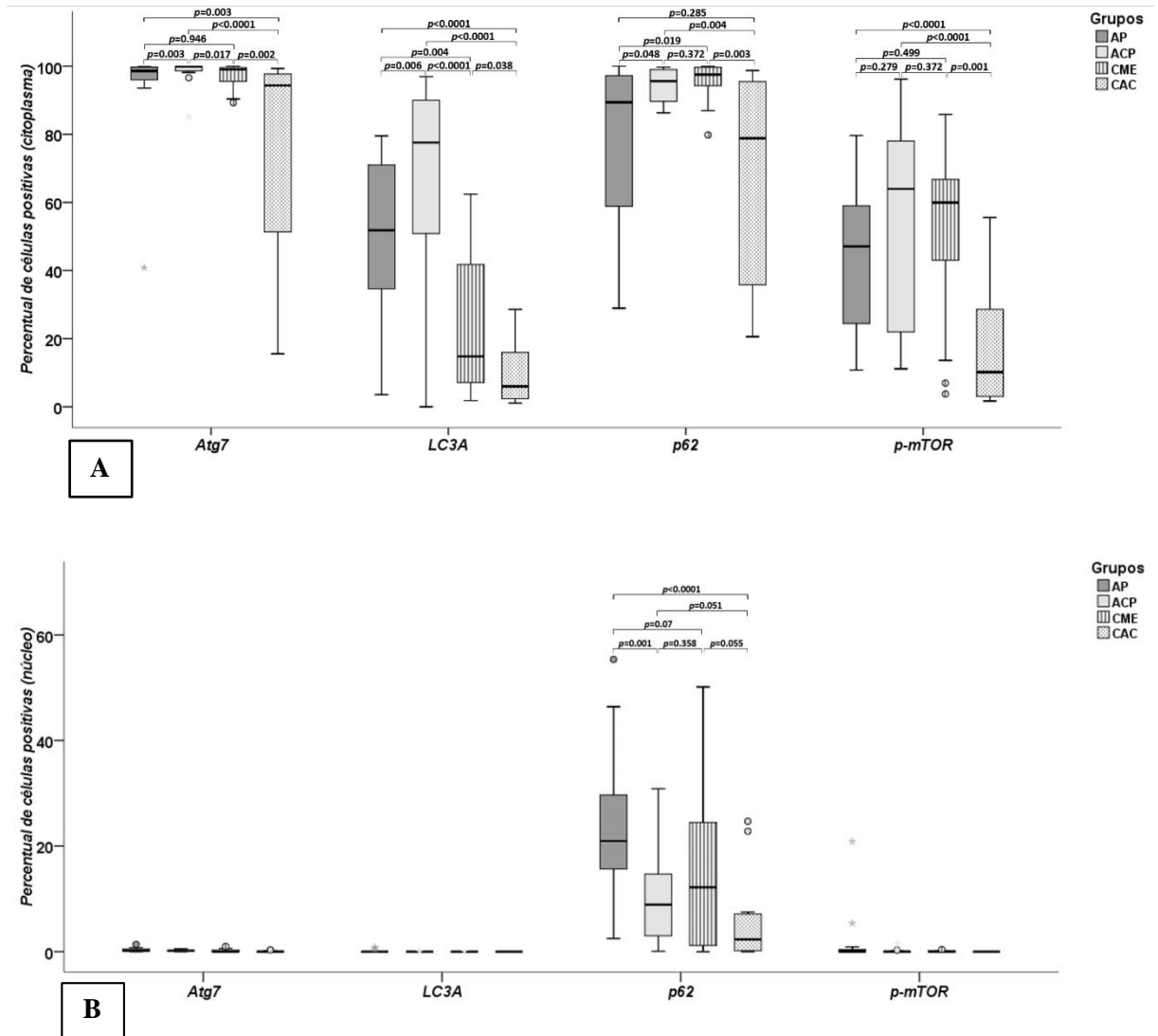


Figura 3. Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade citoplasmática para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao subtipo histológico dos APs (A) e CACs (B) e ao grau histológico de malignidade dos CMEs (C).

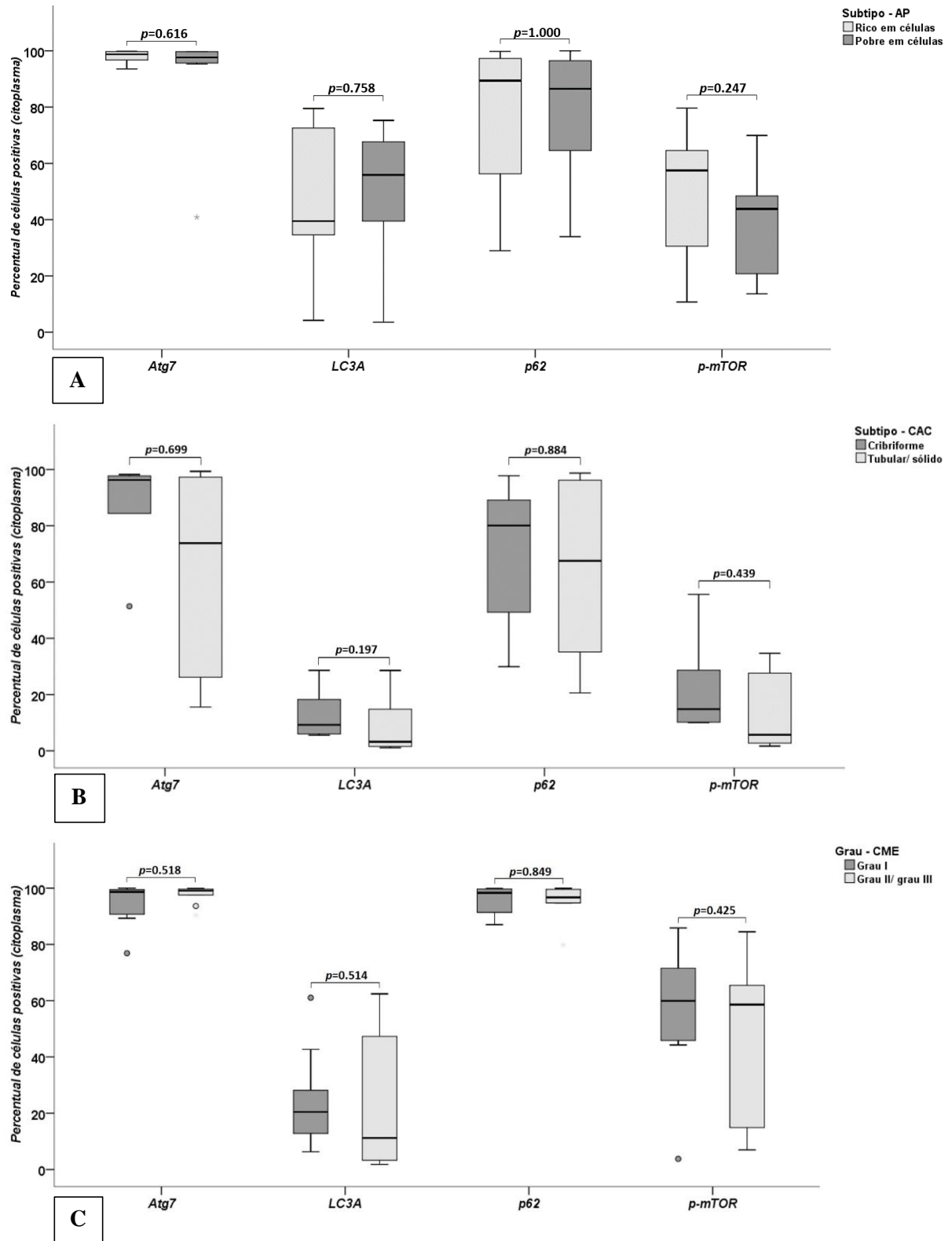


Figura 4. Imunoexpressão de LC3A em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus™, 200×).

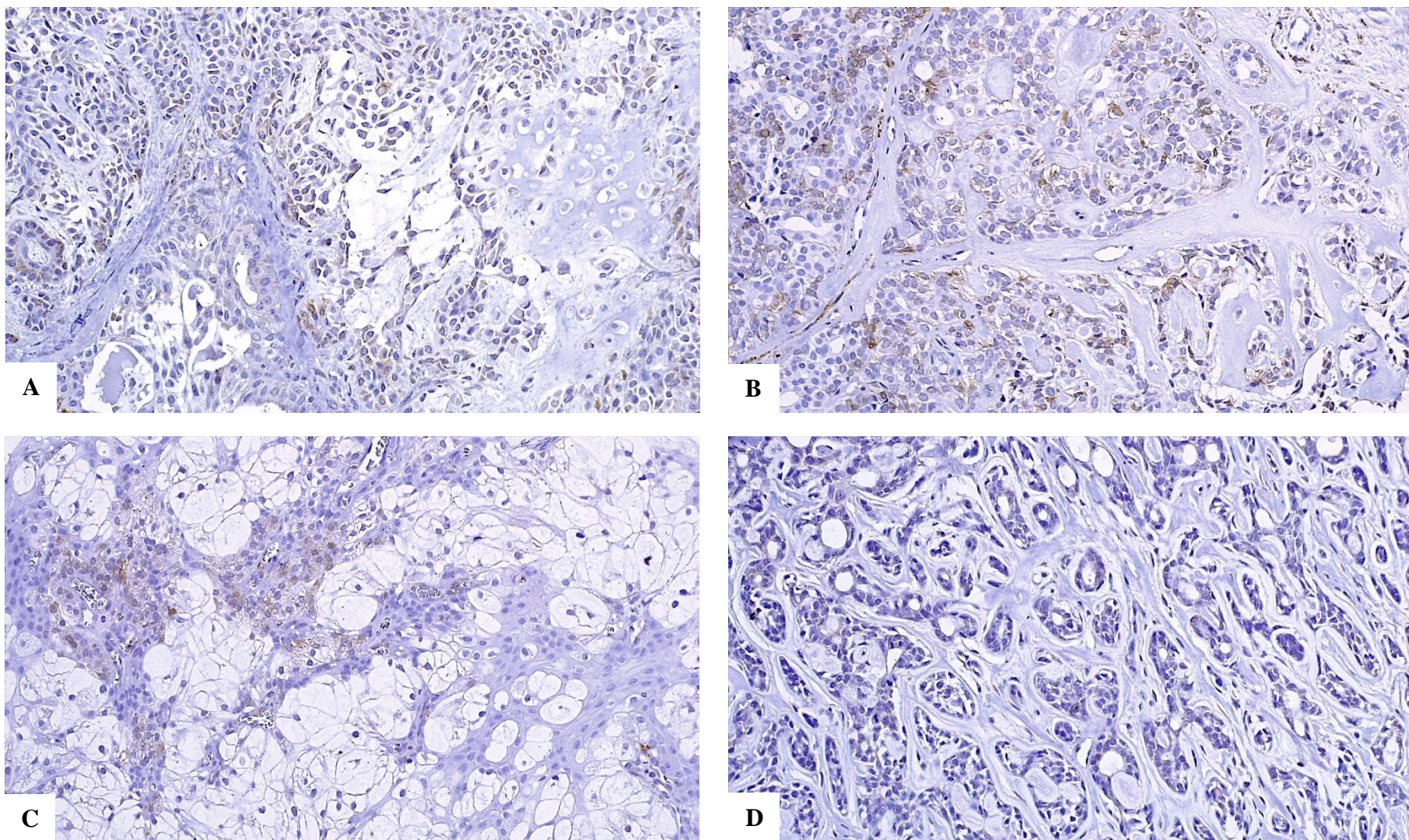


Figura 5. Imunoexpressão de p62 em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus™, 200×).

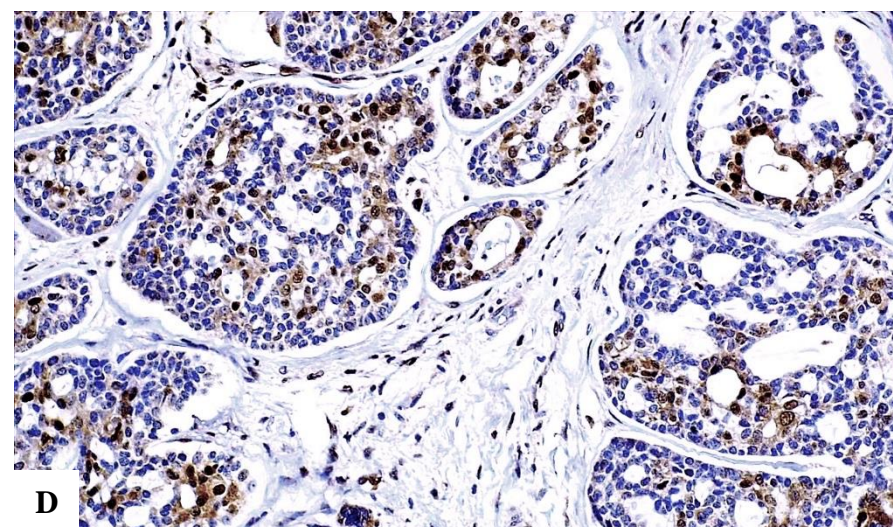
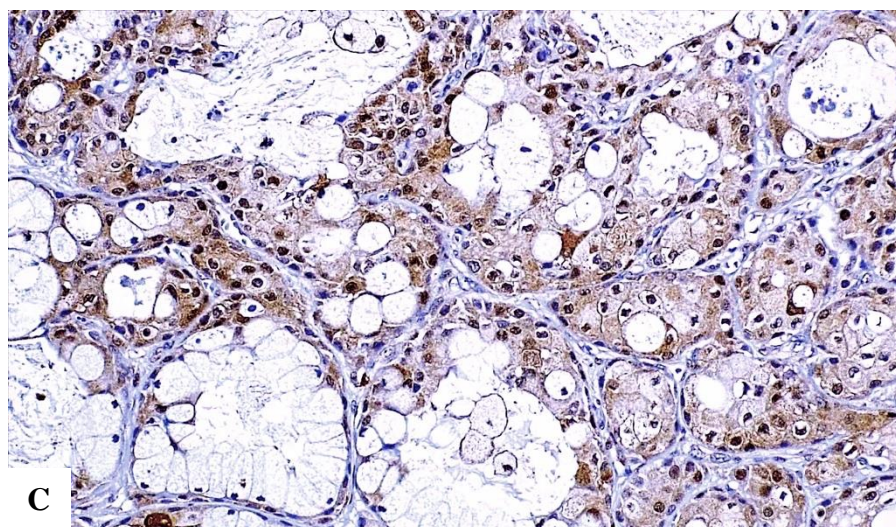
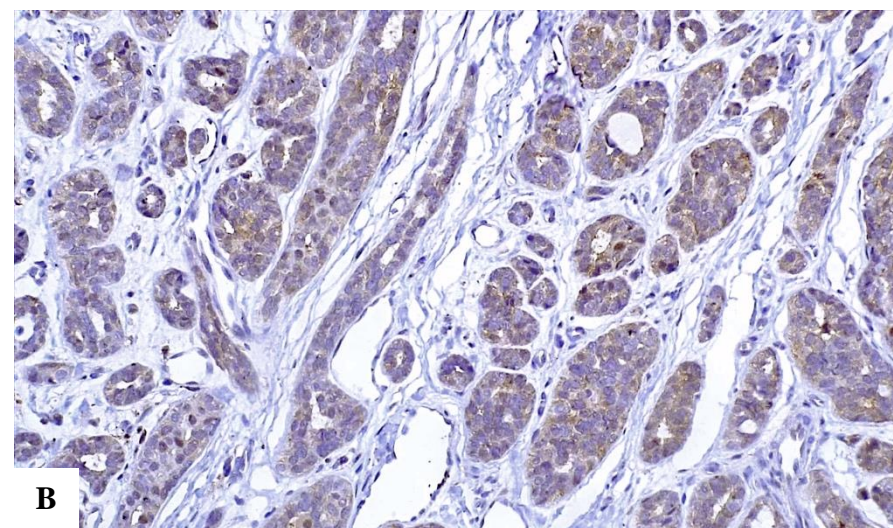
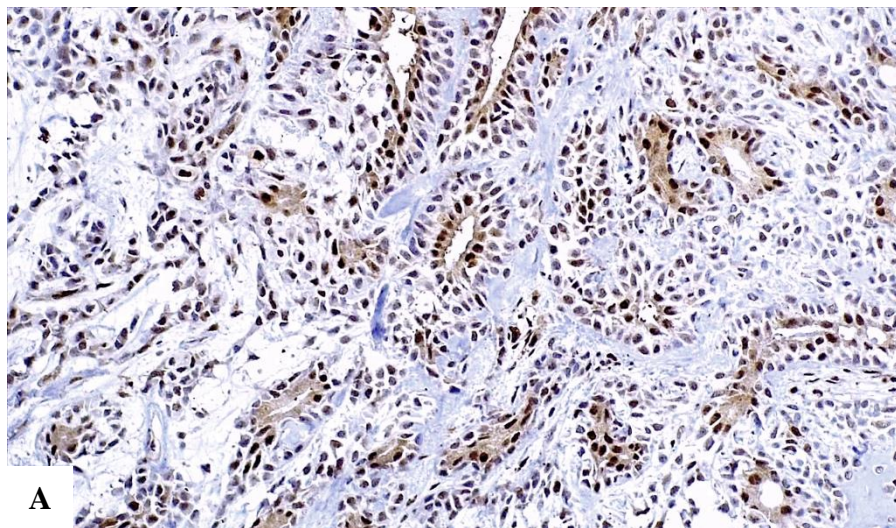


Figura 6. Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade nuclear para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao subtipo histológico dos APs (A) e CACs (B) e ao grau histológico de malignidade dos CMEs (C).

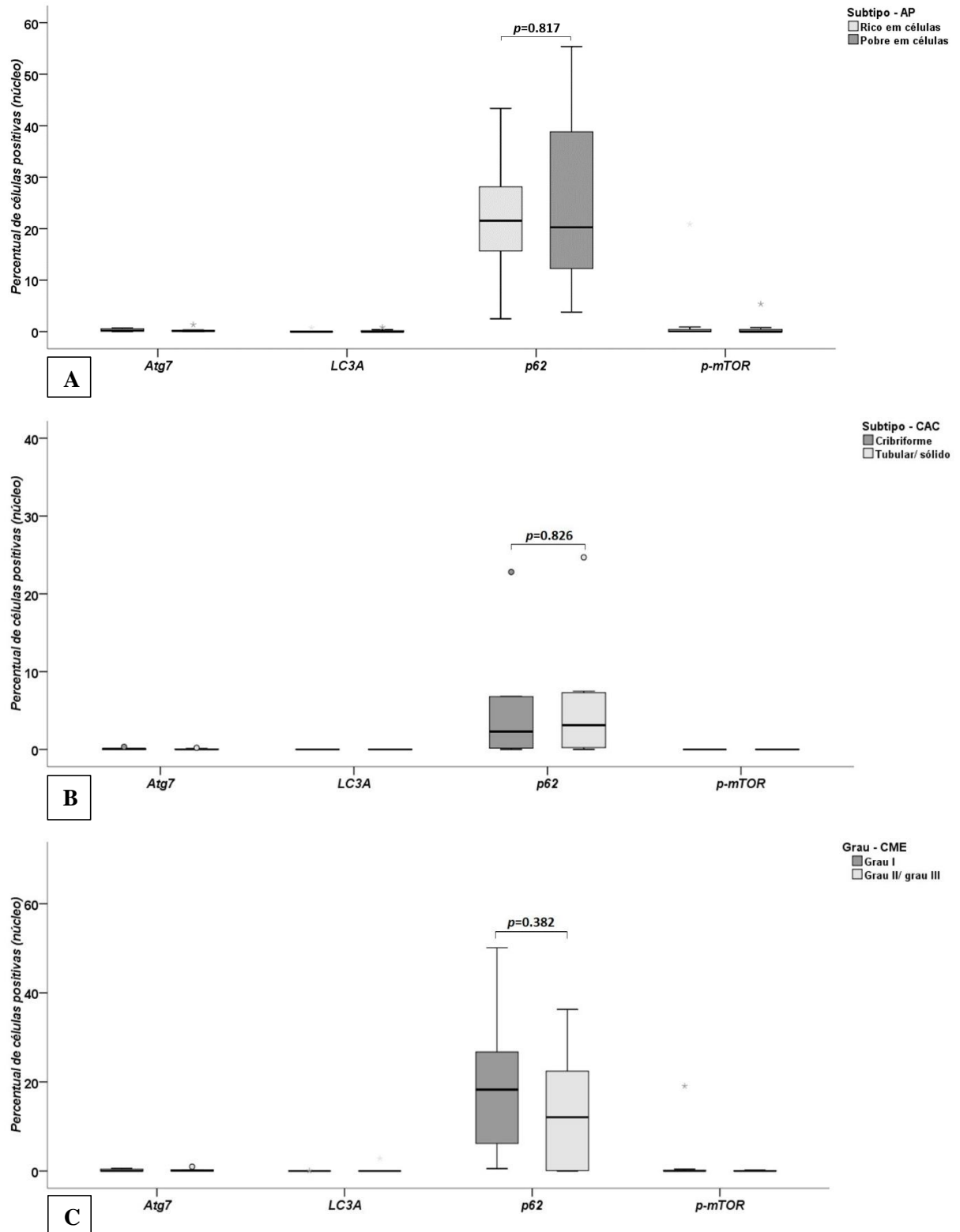
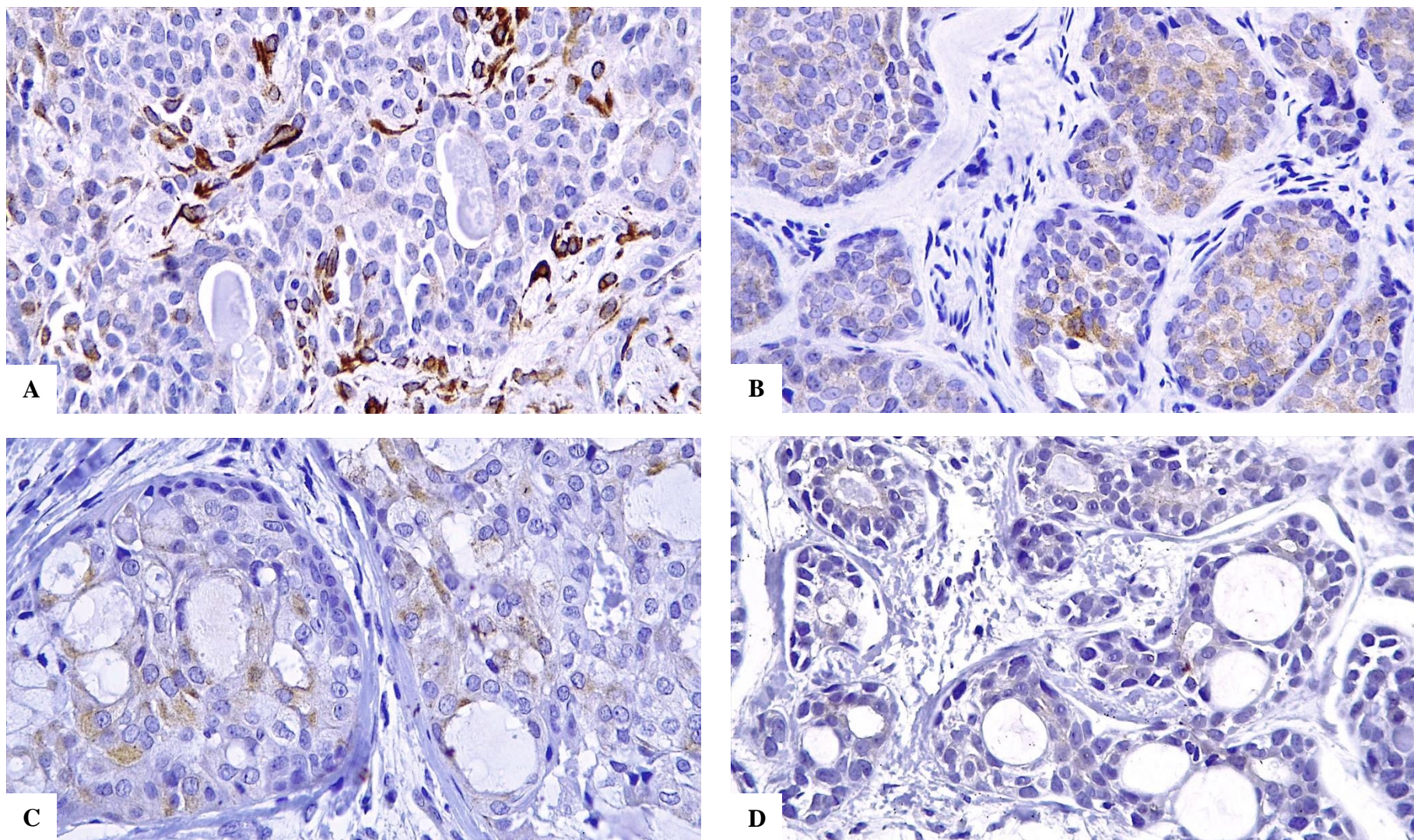


Figura 7. Imunoexpressão de p-mTOR em AP (A), ACP (B), CME (C) e CAC (D) (Immunohistoprobe Plus™, 400×).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

APs, ACPs, CMEs e CACs de glândulas salivares revelam variações em seus constituintes celulares, características histopatológicas e comportamentos clínicos. Apesar do crescente número de estudos que investigam essas lesões, os mecanismos envolvidos na patogênese dessas neoplasias ainda não são completamente compreendidos.

Os resultados deste estudo sugerem uma potencial participação da autofagia na patogênese das neoplasias de glândulas salivares analisadas. Em particular, a regulação positiva desse sistema de catabolismo intracelular e a translocação nuclear reduzida da proteína p62 podem contribuir para o comportamento biológico agressivo dos CACs de glândulas salivares. No que se refere à nucleofagia, esta não parece ter uma atuação significativa na patogênese das neoplasias de glândulas salivares avaliadas.

Pesquisas sugerem que os perfis de expressão de proteínas em neoplasias de glândulas salivares podem estar relacionados à composição celular e ao grau de diferenciação de células epiteliais e mioepiteliais nestas lesões. Porém, no presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas imunoexpressões de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em relação às características histopatológicas de APs, CMEs e CACs.

Assim, os resultados aqui obtidos destacam a importância de novas investigações sobre o tema, que possam contribuir para a melhor compreensão do comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares e para a elaboração de novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKINDURO, O. *et al.* Constitutive autophagy and nucleophagy during epidermal differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 7, p. 1460-1470, 2016.
- ALMESLET, A. S. Pleomorphic adenoma: a systematic review. **International journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 13, n. 3, p. 284-287, 2020.
- ANDREASEN, S. *et al.* Pleomorphic adenoma of the parotid gland 1985-2010: a Danish nationwide study of incidence, recurrence rate, and malignant transformation. **Head and Neck**, v. 38, n. S1, p. E1364-E1369, 2015.
- ANDREASEN, S. *et al.* The PRKD1 E710D hotspot mutation is highly specific in separating polymorphous adenocarcinoma of the palate from adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma on FNA. **Cancer Cytopathology**, v. 126, n. 4, p. 275-281, 2018.
- AHN, M; YOON, J. Histone deacetylase 7 silencing induces apoptosis and autophagy in salivary mucoepidermoid carcinoma cells. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 46, n. 4, p. 276-283, 2017.
- ARSLAN, I. *et al.* The role of insulin-like growth factor I–II receptor on development of pleomorphic adenoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 274, n. 9, p. 3443-3447, 2017.
- ASAHINA, M. *et al.* Clinicopathological effect of PLAG1 fusion genes in pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma with special emphasis on histological features. **Histopathology**, v. 74, n. 3, p. 514-525, 2019.
- BADLANI, J. *et al.* Primary salivary gland malignancies: a review of clinicopathological evolution, molecular mechanisms and management. **ANZ Journal of Surgery**, v. 88, n. 3, p. 152-157, 2018.
- BJØRNDAL, K. *et al.* Salivary adenoid cystic carcinoma in Denmark 1990–2005: outcome and independent prognostic factors including the benefit of radiotherapy. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). **Oral Oncology**, v. 51, n. 12, p. 1138-1142, 2015.
- 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.
- CHEN, G. *et al.* Mammalian target of rapamycin regulates isoliquritigenin-induced autophagic and apoptotic cell death in adenoid cystic carcinoma cells. **Apoptosis**, v. 17, n. 1, p. 90-101, 2012.
- CHEN, J. *et al.* Gene expression profiling analysis of CRTC1-MAML2 fusion oncogene-induced transcriptional program in human mucoepidermoid carcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 803-816, 2015.

CIPRIANI, N. A. *et al.* Mucoepidermoid carcinoma: a comparison of histologic grading systems and relationship to MAML2 rearrangement and prognosis. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 43, n. 7, p. 885-897, 2019.

CLAUDITZ, T. S. *et al.* Abundant expression of mTOR kinase in salivary gland tumors- potentials as therapy target? **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 42, n. 10, p. 769-773, 2013.

CROS, J. *et al.* Expression and mutational status of treatment-relevant targets and key oncogenes in 123 malignant salivary gland tumours. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 10, p. 2624-2629, 2013.

DA 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.

ELHAKIM, M. T. *et al.* Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a danish national study. **Oral Oncology**, v. 55, p. 6-10, 2016.

ELLIS, G. L.; AUCLAIR, P. L. **Atlas of tumor pathology: tumors of the salivary glands**. Third Series, Fascicle 17, p. 268, 1996.

ELLIS, G. L.; AUCLAIR, P. L. **Tumors of the salivary glands. AFIP atlas of tumor pathology**. 4th series, fascicle 9. Silver Spring MD: ARP Press, 2008.

EL-NAGGAR, H.; HUVOS, A. G. Adenoid cystic carcinoma. *In* BARNES, L. *et al.* (Eds) **Pathology and genetics of head and neck tumours**. IARC Press: Lyon, p. 221-222, 2005.

ETTL, T. *et al.* The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localization. **Oral Oncology**, v. 48, n. 9, p. 822-830, 2012.

FAN, L. *et al.* Role of p62 in the regulation of cell death induction. **Apoptosis**, v. 23, n. 3-4, p. 187-193, 2018.

FERRELL, J. K.; MACE, J. C.; CLAYBURGH, D. Contemporary treatment patterns and outcomes of salivary gland carcinoma: a national cancer database review. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 276, n. 4, p. 1135-1146, 2019.

FONSECA, I. *et al.* Polymorphous adenocarcinoma. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. International Agency for Research on Cancer: Lyon, p. 167-168, 2017.

GALLUZZI, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 7, p. 856-880, 2015.

GOODE R. K.; EL-NAGGAR A. K. Mucoepidermoid carcinoma. *In*: BARNES, L. *et al.* **World organization classification of tumors. Pathology and genetics. Head and neck tumours**. Lyon: IARC Press; 2005.

GOULART-FILHO, J. A. V. *et al.* Role of apoptotic, autophagic and senescence pathways in minor salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Diagnostic Pathology**, v. 14-19, n. 1, p. 14, 2019.

GRANIC, M. *et al.* Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma: experience at a single institution based on 64 consecutive patients over a 28-year period. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 3, p. 283-288, 2018.

GRIFFITH, C. C. *et al.* New developments in salivary gland pathology: clinically useful ancillary testing and new potentially targetable molecular alterations. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 3, p. 381-395, 2017.

GROSS, A. S.; GRAEF, M. Mechanisms of autophagy in metabolic stress response. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 1, p. 28-52, 2020.

HE, S. *et al.* Clinicopathologic and prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of head and neck minor salivary glands: a clinical analysis of 130 cases. **American Journal of Otolaryngology**, v. 38, n. 2, p. 157-162, 2017.

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

HUANG, C. *et al.* Expression of LC3, LAMP2, KEAP1 and NRF2 in salivary adenoid cystic carcinoma. **Pathology and Oncology Research**, v. 22, n. 1, p. 109-114, 2015.

JIANG, C. *et al.* Inhibitory effects of silibinin on proliferation and lung metastasis of human high metastasis cell line of salivary gland adenoid cystic carcinoma via autophagy induction. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 6609-6618, 2016.

JIANG, L. *et al.* Expression of autophagy and ER stress-related proteins in primary salivary adenoid cystic carcinoma. **Pathology Research and Practice**, v. 208, n. 11, p. 635-641, 2012.

JIANG, L. C. *et al.* Expression of beclin 1 in primary salivary adenoid cystic carcinoma and its relation to Bcl-2 and p53 and prognosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 252-258, 2014.

KATABI, N. *et al.* Prognostic features in mucoepidermoid carcinoma of major salivary glands with emphasis on tumour histologic grading. **Histopathology**, v. 65, n.6, p. 793-804, 2014.

KATABI, N. *et al.* PLAG1 immunohistochemistry is a sensitive marker for pleomorphic adenoma: a comparative study with PLAG1 genetic abnormalities. **Histopathology**, v. 72, n. 2, p. 285-293, 2018.

KATSURAGI, Y.; ICHIMURA, Y.; KOMATSU, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. **The FEBS Journal**, v. 282, n. 24, p. 4672-4678, 2015.

LI, C. *et al.* Expression of MIF, Beclin1, and LC3 in human salivary gland adenoid cystic carcinoma and its prognostic value. **Medicine**, v. 98, n. 20, p. e15402, 2019.

LI, X.; HE, S; MA, B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 12-27, 2020.

LIANG, L. *et al.* Obatoclox induces Beclin 1- and ATG5-dependent apoptosis and autophagy in adenoid cystic carcinoma cells. **Oral Diseases**, v. 21, n. 4, p. 470-477, 2015.

LUO, M., *et al.* Nuclear autophagy: an evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. **Autophagy**, v. 12, n. 11, p. 1973-1983, 2016.

MA, B. *et al.* Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity in human adenoid cystic carcinoma cells of salivary glands. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 42, n. 10, p. 774-780, 2013.

MARQUARD, F. E.; JÜCKER, M. PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 172, p. 113729-113781, 2020.

MARIZ, B. A. L. A. *et al.* Clinical predictors of malignancy in palatal salivary gland tumors. **Oral Diseases**, v. 25, n. 8, p. 1919-1924, 2019.

MIMICA, X. *et al.* Polymorphous adenocarcinoma of salivary glands. **Oral Oncology**, v. 95, p. 52-58, 2019.

OUYANG, D. Q. *et al.* Risk factors and prognosis for salivary gland adenoid cystic carcinoma in southern china: a 25-year retrospective study. **Medicine**, v. 96, n. 5, p. e5964, 2017a.

OUYANG, D. *et al.* Association between high expression of phosphorylated Akt and mammalian target of rapamycin and improved survival in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Head and Neck**, v. 39, n. 6, p. 1145-1154, 2017b.

ROY, A. *et al.* Protein kinase D signaling in cancer: a friend or foe? **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 283-294, 2017.

SARMENTO, D. J. S. *et al.* Minor intraoral salivary gland tumors: a clinical-pathological study. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 4, p. 508-512, 2016.

SCHAAF, M. B. *et al.* LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un) related functions. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 12, p. 3961-3978, 2016.

SEETHALA, R. R. Salivary gland tumors: current concepts and controversies. **Surgical Pathology Clinics**, v. 10, n. 1, p. 155-176, 2017.

SENTANI, K. *et al.* Characteristics of 5015 salivary gland neoplasms registered in the Hiroshima Tumor Tissue Registry over a period of 39 years. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 5, p. 566-578, 2019.

SOARES, A. B. *et al.* Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 38, n. 8, p. 623-629, 2009.

SOARES, A. B. *et al.* Factors that may influence polymorphous low-grade adenocarcinoma growth. **Virchows Archiv**, v. 470, n. 4, p. 437-443, 2017.

STEVEN, A.; SELIGER, B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 35454-35465, 2016.

SUN, Z. J. *et al.* Mammalian target of rapamycin pathway promotes tumor-induced angiogenesis in adenoid cystic carcinoma: its suppression by isoliquiritigenin through dual activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibition of extracellular signal-regulated kinase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n.2, p. 500-512, 2010.

SUZUKI, S. *et al.* EGFR and HER2–Akt–mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 461, n. 3, p. 271-282, 2012.

TRIANTAFYLLOU, A. *et al.* Functional histology of salivary gland pleomorphic adenoma: an appraisal. **Head and Neck Pathology**, v. 9, n. 3, p. 387-404, 2015.

VALSTAR, M. H. *et al.* Salivary gland pleomorphic adenoma in the Netherlands: A nationwide observational study of primary tumor incidence, malignant transformation, recurrence, and risk factors for recurrence. **Oral Oncology**, v. 66, p. 93-99, 2017.

VANDER POORTEN, V. *et al.* Polymorphous adenocarcinoma of the salivary glands: reappraisal and update. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 275, n. 7, p. 1681–1695, 2018.

WALKER, S. A.; KTISTAKIS, N. T. Autophagosome biogenesis machinery. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 8, p. 2449-2461, 2019.

XU, W. *et al.* Prognostic factors of palatal mucoepidermoid carcinoma: a retrospective analysis based on a double-center study. **Scientific Reports**, v. 7, n. 6, p. 43907, 2017.

XU, B. *et al.* Predictors of outcome in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic study with correlation between MYB fusion and protein expression. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 41, n. 10, p. 1422-1432, 2017.

YAN, K. *et al.* Genomics of mucoepidermoid and adenoid cystic carcinomas. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v. 3, n. 1, p. 56-61, 2018.

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

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSIONÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Pesquisador: Cassiano Francisco Weege Nonaka

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 07940519.5.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.155.854

Apresentação do Projeto:

É um estudo observacional de corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunorexpressões das proteínas Atg7, LC3, p62 e mTOR em APs, CACs, CMEs e ACPs de glândulas salivares. O projeto apresenta-se bem formatado e com boa justificativa.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo objetiva avaliar a imunorexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3, p62 e mTOR) em APs, CACs, CMEs e ACPs de glândulas salivares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em se tratando de uma pesquisa que realizará a coleta de dados em fichas clínicas e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivo, não apresenta riscos. Apresenta como maior benefício esperado, a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na etiopatogênese das neoplasias de glândula salivar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta do projeto é relevante e contribuirá para o conhecimento da etiopatogênese das neoplasias de glândula salivar, uma vez que há raros estudos sobre o tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os termos de apresentação obrigatória.

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

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



Continuação do Parecer: 3.155.854

Recomendações:

O projeto apresenta relevância e está bem delineado, sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta todos os termos obrigatórios e apresenta relevância. O projeto está aprovado salvo melhor atendimento. Solicitamos, que no decorrer da Pesquisa e ao Final da Pesquisa sejam apresentados Relatório Parcial e Final respectivamente.

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_P ROJETO_1291788.pdf	14/02/2019 21:43:44		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	14/02/2019 20:56:52	Emanuene Galdino Pires	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	12/02/2019 21:10:38	Emanuene Galdino Pires	Aceito
Outros	Autorizacao_UNIFOR_2.pdf	12/02/2019 21:09:35	Emanuene Galdino Pires	Aceito
Outros	Autorizacao_UNIFOR_1.pdf	12/02/2019 21:08:46	Emanuene Galdino Pires	Aceito
Outros	Autorizacao_UEPB.pdf	12/02/2019 21:07:45	Emanuene Galdino Pires	Aceito
Outros	Autorizacao_HospitalLaureano_2.pdf	12/02/2019 21:06:27	Emanuene Galdino Pires	Aceito
Outros	Autorizacao_HospitalLaureano_1.pdf	12/02/2019 21:05:35	Emanuene Galdino Pires	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	12/02/2019 16:45:05	Emanuene Galdino Pires	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

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



Continuação do Parecer: 3.155.854

CAMPINA GRANDE, 20 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Dóris Nóbrega de Andrade Laurentino
(Coordenador(a))

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

ANEXO B – Normas para submissão de artigos ao periódico *Archives of Oral Biology*

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Professor S W Cadden, Dundee, Scotland

Dr Fionnuala T. Lundy, Northern Ireland, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the **Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals**

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches.

Submission declaration and verification

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

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following.

Authorship

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

Article transfer service

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

Copyright

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

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

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

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

ROLE OF THE FUNDING SOURCE

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

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final.

Use of word processing software

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

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

ARTICLE STRUCTURE

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper),

Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above.

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

ESSENTIAL TITLE PAGE INFORMATION

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List

here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be anglicized e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. '*meningococcus*'

ARTWORK

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

APA (American Psychological Association) 7th Edition

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. *List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with

your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.

- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
 - Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
 - Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
 - n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P < 0.0005$.

AUTHOR INQUIRES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.