



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

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA ISOFORMA ALFA DO RECEPTOR DE  
GLICOCORTICOIDE E DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA  
CARCINOGENESE LABIAL**

**LUANA SAMARA BALDUINO DE SENA**

**CAMPINA GRANDE/ PB**

**2021**

**LUANA SAMARA BALDUINO DE SENA**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSION DA ISOFORMA ALFA DO RECEPTOR DE  
GLICOCORTICOIDE E DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA  
CARCINOGENESE LABIAL**

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**

**2021**

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.

S474a Sena, Luana Samara Balduino de.  
Análise da imunexpressão da isoforma alfa do receptor de glicocorticoide e de proteínas relacionadas à autofagia na carcinogênese labial [manuscrito] / Luana Samara Balduino de Sena. - 2021.  
118 p. : il. colorido.  
  
Digitado.  
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2022.  
"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka , Departamento de Odontologia - CCBS."  
  
1. Queilite. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Receptores de glucocorticoides. 4. Autofagia. I. Título  
21. ed. CDD 617.6

**LUANA SAMARA BALDUINO DE SENA**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSION DA ISOFORMA ALFA DO RECEPTOR DE  
GLICOCORTICOIDE E DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA  
CARCINOGENESE LABIAL**

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: 17/12/2021**

**BANCA EXAMINADORA**



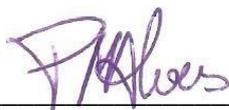
---

**Profa. Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira/ UFRN**  
**Membro titular (1º Examinador)**



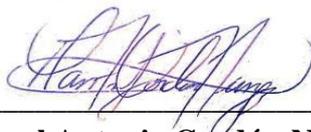
---

**Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro/ UFCG**  
**Membro titular (2º Examinador)**



---

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



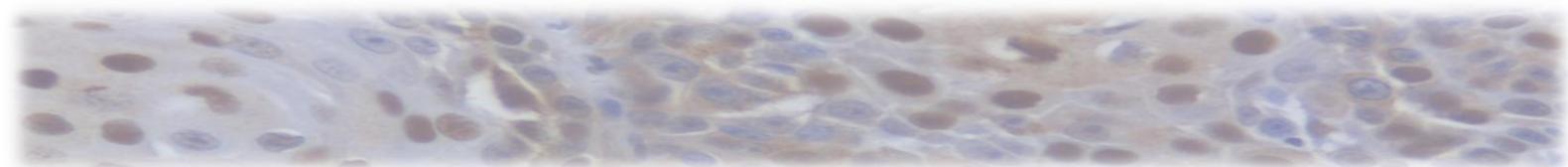
---

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



---

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



DEDICATÓRIA

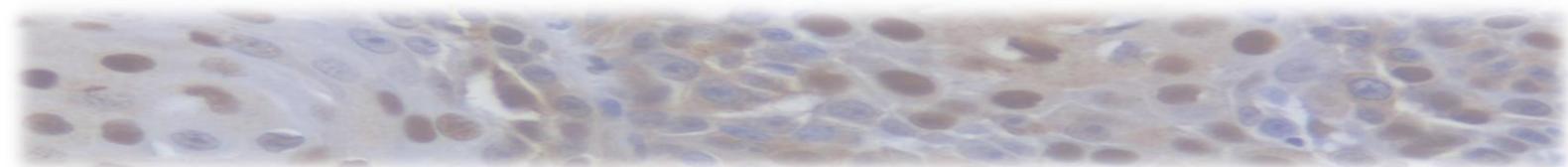
**Dedico este trabalho a Deus, fonte de amor eterno,**

**Aos meus pais, minha base e fortaleza,**

**Ao meu filho João Miguel Balduino Andrade, é tudo por ele e para ele,**

**Ao meu esposo Jamesson de Macedo Andrade, meu companheiro de vida,**

**Ao meu orientador Cassiano Francisco Weege Nonaka, esse trabalho é nosso!**



AGRADECIMENTOS

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador Professor **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka!** Nesse momento a gente não sabe nem por onde começar, é difícil quando se tem tantos motivos para agradecer. Professor Cassiano, o quão sou grata pelos seus ensinamentos, pelo tempo dedicado a mim e a todas as suas orientandas, tempo esse de muito aprendizado, de muita transmissão de conhecimentos, tempo de abdicção da sua família, de seus projetos de vida para poder contribuir com nossa formação com tanto zelo, cuidado e amor pelo que faz! Sua dedicação é inspiradora! Muito obrigada por ser mais que um orientador, ser um amigo, aquele que torce por nossas conquistas e vibra com cada realização profissional e pessoal, gratidão por todo empenho dedicado na realização desta pesquisa e na minha formação, por todos os conselhos, tão sábios e cheios de experiência, pelas correções e sugestões que sempre foram muito valiosas e construtivas. Quando cheguei na UEPB, no mestrado, cheia de expectativas e vontade de aprender, Deus, como sempre esteve à frente de tudo, trilhando os meus caminhos, me permitiu ter o privilégio de ser sua orientanda, e, em sequência, no doutorado! Foram 6 anos e meio de aprendizado, de conhecimento, de orientação, de amizade! Tenho muito orgulho de dizer meu orientador é o professor **Cassiano Nonaka!** O maior e melhor pesquisador que já conheci! Obrigada por confiar em mim, no meu trabalho, para desenvolver pesquisas tão cheias de conhecimento científico, sou grata por toda paciência e por sempre me compreender nos momentos de dificuldade e dúvidas. És o exemplo de professor que quero ser, uma pessoa dedicada, atenciosa, inteligente, compreensível, paciente e que ama o que faz!  
**GRATIDÃO!**

## **AGRADECIMENTOS**

“A etimologia da palavra gratidão vem da expressão latina *gratus*, que é traduzida como estar agradecido ou ser grato. Reconhecimento por um benefício recebido; agradecimento: dar provas de gratidão”.

A *Deus* todo poderoso e onipotente, quão grata sou a ti por tantas graças alcançadas, por fazer mais do que eu sonhei, por realizar tanto em minha vida, por estar comigo em todos os momentos, a cada instante sinto teu grande amor, tua misericórdia e bondade! Ao longo desses anos, o Senhor nunca me abandonou, sempre me agraciando, me mostrando o quanto sou forte, que quando a gente sonha, o Senhor realiza! Desde o primeiro período do curso, eu sonhava com a vida acadêmica, e o Senhor foi trilhando minha caminhada, eis que chegou o tão esperado doutorado, ah Deus, tu tens sido tão bom comigo! As vezes custo a acreditar se eu mereço tanto! Te agradeço Deus! Meu coração é só GRATIDÃO!

À *Nossa Senhora das Graças*, minha mãezinha, que sempre esteve ali, orando por sua filha, e intercedendo ao Altíssimo por minhas preces, sonhos e desejos!

Aos meus pais, paiinho (*Luciano Alves de Sena*) e mainha (*Sandra Valéria Balduino de Sena*), vocês que acreditaram no meu sonho e sonharam juntos comigo, lutaram, batalharam e não perderam a guerra, se hoje cheguei até aqui, devo tudo a vocês, obrigada pela educação que me deram, por proporcionar tanto a mim e aos meus irmãos, diante de tantas dificuldades vocês venceram, vocês sim! Agora como mãe, consigo mensurar um pouco do amor de vocês com seus filhos, quanto cuidado, dedicação, zelo e tantas outras coisas! Eu amo vocês e eu sou eternamente grata por tudo que fazem por mim! Mainha que esteve comigo mais que nunca nessa reta final, cuidando do meu filho para que eu conseguisse desenvolver as minhas atividades, muita gratidão minha mãe!

Ao meu companheiro de todas as horas, meu esposo *Jamesson de Macedo Andrade*, muito obrigada marido, por todo amor, carinho, paciência, compreensão, cuidado, por tantas renúncias junto comigo, por me apoiar, estar comigo, por todas as palavras de incentivo, por me fazer uma pessoa melhor, agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida, por ter me dado mais que um marido, e sim um melhor amigo, por partilharmos a mesma história,

por vibrarmos juntos por cada conquista e crescermos juntos! E Deus ainda mostrando o quanto Ele nos ama, nos deu nosso maior presente, nosso filho **João Miguel!**

Ao meu filho amado, **João Miguel Balduino Andrade**, meu baby JM, como tens me ensinado, desde a gestação, numa pandemia, com medos e anseios, tu meu filho, fostes criando uma nova mulher dentro de mim, aquela que você chama de mamã! Obrigada por permitir que eu seja teu Porto Seguro, que eu seja fonte de amor, fonte de alimento, de ternura, de cuidado! E aquela frase “quando nasce um filho, nasce uma mãe”, ela tem tanta verdade, a gente se sente insegura, é como se estivéssemos aprendendo a nadar, a gente não sabe o que vem depois, mas a gente continua, por você, para você! “Meu pedacinho de céu, eu vejo Deus em você, cada dia eu te amo mais, obrigada por me escolher”.

Aos meus irmãos, **Katia Mayane Balduino Torres e Heberton Richer Balduino de Sena**, obrigada por tanto apoio, por todas as palavras, por torcerem por mim e vibrarem a cada realização e conquista, o mundo é mais leve porque tenho vocês comigo! Quem tem irmãos, sabe que nunca estará sozinho, pois, aconteça o que acontecer, esse laço é para a vida toda! Minha irmã **Mayane** sou tão grata por tua vida, por ser tua irmã, obrigada por todos os momentos de companheirismo, de palavra amiga, de apoio, por torcer por mim sempre e está comigo a todo tempo, obrigada por sua amizade!

A minha **tia Lela**, que esteve sempre torceu por mim, e esteve junto nessa caminhada, meus sobrinhos **Camila Balduino Torres e Túlio Balduino Torres**, por alegrarem meus dias, meus filhos do coração!

Aos meus colegas de turma de **Doutorado**, pela amizade de cada um, pelo conhecimento compartilhado! Em especial, aos meus amigos **Luan Éverton e Ana Priscila**.

Ao meu querido amigo **Luan Éverton Galdino Barnabé**, minha eterna dupla, sabe aquele amigo que a gente ganha e que parece que vem de outras vidas, é assim nossa irmandade, muito obrigada pela tua amizade e carinho, por sempre estar disposto a ajudar, pelos conselhos, pelas boas risadas, pela vivência e momentos de descontração.

Com você minha amiga **Ana Priscila Lira de Farias Freitas**, não foi diferente, sou muito grata pela sua vida, sua amizade, carinho, lealdade e cumplicidade, desde o mestrado criamos um laço de amizade tão lindo que quero levar para sempre.

A todos os amigos do laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB: **Allany Andrade, Christany Rodrigues, Emanuene Galdino, Daniella Lucena, Fabianna Medeiros, Ingrid Morgana, Amanda Lira, Walter Morais e Wliana Pontes**, por todo aprendizado compartilhado, pela parceria, por tornar o ambiente de estudos, um ambiente familiar!

À **Christany Rodrigues** e **Amanda Lira** pela disposição em ajudar e contribuir com o desenvolvimento deste trabalho, bem como pela amizade e incentivos constantes.

À **Allany Andrade**, obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelos momentos compartilhados, sua amizade levarei para a vida.

À **Emanuene Galdino**, Manu, você é um ser iluminado, carrega alegria por onde passa, cheia de fé, uma amiga inteligente, dedicada e amável, obrigada por sua amizade.

À **Daniella Lucena**, Dani, teu jeito divertido e descontraído é contagiante, és uma menina encantadora, admirável, batalhadora, carregarei sua amizade sempre comigo!

À **Ingrid Morgana**, sempre sorridente, disposta a ajudar, mulher forte, guerreira, você merece o mundo amiga! Que Deus abençoe sua trajetória, obrigada pela sua amizade!

Ao professor **Tiago João** pela solicitude, sempre disposto a ajudar, por todo apoio e conselhos!

À técnica do laboratório e, também uma irmã que eu ganhei **Ana Luzia Araújo Batista**! Obrigada pelo teu carinho e acolhimento, por transmitir uma fé inabalável, por esse ser incrível e evoluído que você é, uma pessoa admirável, de um coração grandioso, sempre disposta a ajudar e ensinar! Quero você sempre fazendo parte de minha vida!

À técnica do laboratório **Denize Núbia**, pela amizade, cuidado e carinho que sempre teve comigo, por sempre contribuir com nossas pesquisas, pelos ensinamentos, teu jeito de ser deixa tudo mais leve, mais divertido e nos tira boas risadas.

Aos meus sogros **Eunice** e **Fernando**, pelo apoio e palavras de incentivo que me foram dados.

A todos os professores do **PPGO/UEPB** e colaboradores, que compartilharam seus conhecimentos, nos tornando além de profissionais, verdadeiros seres humanos! A secretária **Ahyanna Nóbrega** por todo auxílio.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta Tese Profa. ***Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira***; Profa. ***Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro***, Profa. ***Dra. Pollianna Muniz Alves***, Prof. ***Dr. Manuel Antônio Gordón-Nuñez***, pelo aceite em participar desta banca e pela dedicação na leitura deste trabalho!

À professora ***Dra. Pollianna Muniz Alves***, por todas as considerações e sugestões, contribuindo para o desenvolvimento desta pesquisa, por sempre estar disposta a ajudar, por transmitir seus conhecimentos com uma leveza, sua didática é encantadora!

À professora ***Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira***, pelas contribuições dadas para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora ***Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro***, pela amizade, pelo carinho e exemplo de profissional e pessoa! Tua simplicidade, acolhimento e generosidade são virtudes encantadoras!

Ao professor ***Dr. Manuel Antônio Gordón-Nuñez***, pela disposição em ajudar e contribuir com seus conhecimentos.

À professora e amiga ***Dra. Carmen Medeiros*** e seu esposo ***Paulo Medeiros***, pela amizade e carinho, por torcerem por mim e por minha família!

Aos amigos que sempre me apoiaram e torceram por mim durante essa caminhada: minha cunhada ***Ana Cláudia, Rafaela Moura, Andressa Valadares***, minha eterna dupla ***Nelmara Sousa***, meus amigos da Universidade ***Dayane Siqueira, Diogo Andrade, Mayanna Freitas, Thamyres Simões, Anny Mirene, Rodolfo Amador e Berthiene Medeiros***.

Aos amigos que conquistei e que muito contribuíram nas diversas etapas da minha vida: ***Cidinha*** que com tanto carinho e amor cuida do meu bem mais precioso, meu filho, sou só gratidão a você! ***Itaiany Brito*** minha doula, que tenho um carinho enorme e fez parte do momento mais lindo da minha vida, as minhas amigas ***Williane Balduino, Géssica Gomes, Carla Rayssa e Dra. Edileuza Lima***, obrigada pelo carinho, cuidado e atenção.

Aos professores, funcionários e técnicos do **Departamento de Odontologia da UEPB**. Em especial às professoras ***Bruna Santos, Raquel Gomes e Renata Coelho*** que me acolheram tão bem durante esse período como substituta nessa instituição e a secretária ***Jocelma*** por todo auxílio.

*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 finalização desta pesquisa, bem como para minha vida pessoal! **GRATIDÃO!**

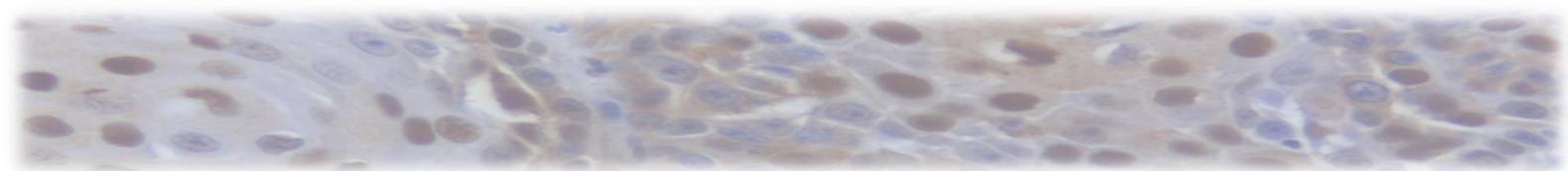


RESUMO

## RESUMO

A exposição crônica à radiação ultravioleta (UV) pode provocar alterações celulares e culminar com o surgimento de desordens potencialmente malignas, com destaque para a queilite actínica (QA). As taxas de transformação maligna dessa lesão em um carcinoma de células escamosas (CCE) podem chegar a 30%, mas os eventos moleculares envolvidos neste processo permanecem incompletamente compreendidos. Diversas pesquisas têm enaltecido a participação da isoforma do receptor de glicocorticoide (RG $\alpha$ ) e da autofagia, um importante mecanismo intracelular catabólico, no desenvolvimento e progressão de neoplasias malignas. Embora a RG $\alpha$  e a autofagia se apresentem como objetos de intensa investigação científica, até o momento, pouco se sabe sobre seu envolvimento na carcinogênese labial. Dessa forma, este estudo se propôs a avaliar a imunexpressão da RG $\alpha$  e de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em casos de QA e CCE de lábio inferior (CCELI). A amostra foi composta por 40 casos de QA e 40 casos de CCELI. Dados clínicos (sexo e idade dos pacientes, tamanho/extensão do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico) foram coletados em fichas de requisição de exame histopatológico e de prontuários médicos. Para o estudo morfológico, foram analisados o grau de displasia epitelial nas QAs e o grau histopatológico de malignidade no *front* de invasão dos CCELI. No estudo imunohistoquímico, foram estabelecidos os percentuais de células epiteliais positivas (núcleo e citoplasma) para RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em 5 campos microscópicos do revestimento epitelial das QAs e em 10 campos do *front* de invasão dos CCELI. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio dos testes de Mann-Whitney e de correlação de Spearman ( $p < 0,05$ ). Foi constatada imunexpressão nuclear e citoplasmática de RG $\alpha$  em todos os casos de QA e CCELI, com altos percentuais de positividade. Comparadas às QAs, os CCELI exibiram maiores percentuais de expressão citoplasmática ( $p < 0,001$ ) e menores percentuais de positividade nuclear para RG $\alpha$  ( $p = 0,021$ ). Por sua vez, as QAs apresentaram maiores expressões citoplasmáticas de LC3A ( $p < 0,001$ ), p62 ( $p = 0,003$ ) e p-mTOR ( $p < 0,001$ ). Considerando os parâmetros clinicopatológicos das lesões, foram identificadas diferenças estatisticamente significativas para as imunexpressões de RG $\alpha$  e LC3A. Nesse sentido, CCELI com alto grau de malignidade apresentaram maiores percentuais de positividade citoplasmática para RG $\alpha$  quando comparados aos tumores com baixo grau de malignidade ( $p = 0,016$ ). Além disso, nas QAs, casos com baixo grau de displasia epitelial exibiram maiores percentuais de positividade nuclear para LC3A quando comparados aos casos com alto grau de displasia epitelial ( $p = 0,004$ ). Tanto nas QAs quanto nos CCELI, foram constatadas correlações positivas entre as imunexpressões citoplasmáticas e nucleares de todas as proteínas analisadas ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, nos CCELI e nas QAs, foram observadas correlações positivas entre as imunexpressões de proteínas relacionadas à autofagia ( $p < 0,05$ ). Em nenhum dos grupos foi identificada correlação estatisticamente significativa entre as expressões de RG $\alpha$  e das proteínas relacionadas à autofagia ( $p > 0,05$ ). Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que a translocação nuclear reduzida da RG $\alpha$  e a regulação positiva da autofagia constituam eventos importantes na carcinogênese labial, mas provavelmente não estão envolvidos na progressão dos CCELI. Nesse processo, o papel da RG $\alpha$  pode não estar primariamente relacionado à modulação das expressões das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR.

**Palavras-chave:** Queilite. Carcinoma de células escamosas. Receptores de glucocorticoides. Autofagia.



ABSTRACT

## ABSTRACT

Chronic exposure to ultraviolet (UV) radiation is capable of causing cellular changes and culminating in the development of potentially malignant disorders, especially actinic cheilitis (AC). The rates of malignant transformation of this lesion into a squamous cell carcinoma (SCC) can reach 30%, but the molecular events involved in this process remain incompletely understood. Several studies have highlighted the participation of the glucocorticoid receptor isoform  $\alpha$  (GR $\alpha$ ) and autophagy, an important intracellular catabolic mechanism, in the development and progression of malignant neoplasms. Although GR $\alpha$  and autophagy are objects of intense scientific investigation, so far, little is known about their involvement in lip carcinogenesis. Thus, this study aimed to evaluate the immunoexpression of GR $\alpha$  and autophagy-related proteins (Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR) in cases of AC and lower lip squamous cell carcinoma (LLSCC). The sample consisted of 40 cases of AC and 40 cases of LLSCC. Clinical data (patients' sex and age, tumor size/extension, regional lymph node metastasis, distant metastasis and clinical stage) were collected in histopathological examination requisition forms and medical records. For the morphological study, the degree of epithelial dysplasia in the ACs and the histopathological degree of malignancy in the LLSCC invasion front were analyzed. In the immunohistochemical study, the percentages of positive epithelial cells (nucleus and cytoplasm) for GR $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR were established in 5 microscopic fields of the epithelial lining of ACs and in 10 fields of the LLSCC invasion front. The data obtained were statistically analyzed using the Mann-Whitney and Spearman correlation tests ( $p < 0.05$ ). GR $\alpha$  nuclear and cytoplasmic immunoexpression was found in all cases of AC and LLSCC, with high percentages of positivity. Compared to ACs, LLSCCs exhibited higher percentages of cytoplasmic expression ( $p < 0.001$ ) and lower percentages of nuclear positivity for GR $\alpha$  ( $p = 0.021$ ). On the other hand, ACs exhibited higher cytoplasmic expressions of LC3A ( $p < 0.001$ ), p62 ( $p = 0.003$ ) and p-mTOR ( $p < 0.001$ ). Considering the clinicopathological parameters of the lesions, statistically significant differences were identified for the immunoexpression of GR $\alpha$  and LC3A. In this sense, LLSCCs with a high degree of malignancy had higher percentages of cytoplasmic positivity for GR $\alpha$  when compared to tumors with a low degree of malignancy ( $p = 0.016$ ). Furthermore, in ACs, cases with a low degree of epithelial dysplasia exhibited higher percentages of nuclear positivity for LC3A when compared to cases with a high degree of epithelial dysplasia ( $p = 0.004$ ). Both in ACs and LLSCCs, positive correlations were found between cytoplasmic and nuclear immunoexpression of all analyzed proteins ( $p < 0.05$ ). Additionally, in LLSCCs and ACs, positive correlations were observed between the immunoexpression of autophagy-related proteins ( $p < 0.05$ ). No significant correlations were found between the expressions of GR $\alpha$  and autophagy-related proteins in none of the groups ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the results of this study suggest that reduced nuclear translocation of GR $\alpha$  and upregulation of autophagy are important events in lip carcinogenesis, but are probably not involved in the progression of LLSCCs. In this process, the role of GR $\alpha$  may not be primarily related to the modulation of Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR protein expressions.

**Keywords:** Cheilitis. Squamous cell carcinoma. Glucocorticoid receptors. Autophagy.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Akt:** Do inglês *serine/threonine kinase*, refere-se a proteína Akt.
- AMPK:** Do inglês *protein kinase AMP-activated*, traduzido como proteína quinase ativada por AMP.
- ATG:** Do inglês *autophagy-related genes*, traduzido como genes relacionados à autofagia.
- Atg3:** Do inglês *autophagy-related 3*, traduzido como proteína relacionada à autofagia 3.
- Atg5:** Do inglês *autophagy-related 5*, traduzido como proteína relacionada à autofagia 5.
- Atg7:** Do inglês *autophagy-related 7*, traduzido como proteína relacionada à autofagia 7.
- Atg10:** Do inglês *autophagy-related 10*, traduzido como proteína relacionada à autofagia 10.
- Atg12:** Do inglês *autophagy-related 12*, traduzido como proteína relacionada à autofagia 12.
- Atg16L1:** Do inglês *autophag-related 16 like 1*, traduzido como proteína relacionada à autofagia 16L1.
- ATP:** Adenosina trifosfato.
- BAX:** Do inglês *Bcl-2-associated X protein*, refere-se à proteína BAX.
- BCL-2:** Do inglês *B-cell lymphoma 2*, refere-se à proteína BCL-2.
- BECN1:** Do inglês *beclin 1*, traduzido como beclina 1.
- CA:** Califórnia (Estado norte-americano).
- CCE:** Carcinoma de células escamosas.
- COX-2:** Do inglês *ciclooxigenase-2*, traduzido como ciclooxigenase-2.
- DAB:** Do inglês *3,3'-diaminobenzidine*, traduzido como 3,3'-diaminobenzidina.
- DNA:** Do inglês *deoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico.
- GβL:** Do inglês *G protein β-subunit-like protein*, traduzido como subunidade β-like da proteína G.
- IL-6:** Do inglês *interleukyn-6*, traduzido como interleucina-6.
- IL-8:** Do inglês *interleukyn-8*, traduzido como interleucina-8.
- LC3:** Do inglês *microtubule-associated protein 1 light chain 3*, traduzido como

	cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo.
<b>LC3-I:</b>	Do inglês <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3-I</i> , traduzido como cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo-I.
<b>LC3-II:</b>	Do inglês <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3-II</i> , traduzido como cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo-II.
<b>MO:</b>	Missouri (Estado norte-americano).
<b>mTOR:</b>	Do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i> , traduzido como proteína alvo da rapamicina em mamíferos.
<b>NFκB:</b>	Do inglês <i>nuclear factor kappa B</i> , traduzido como fator nuclear kappa B.
<b>NJ:</b>	New Jersey (Estado norte-americano).
<b>OMS:</b>	Organização Mundial da Saúde.
<b>PCR:</b>	Do inglês <i>polymerase chain reaction</i> , traduzido como reação em cadeia da polimerase.
<b>pH:</b>	Potencial hidrogeniônico.
<b>P21:</b>	Do inglês <i>protein p21</i> , refere-se a proteína p21.
<b>P27:</b>	Do inglês <i>protein p27</i> , refere-se a proteína p27.
<b>P62:</b>	Do inglês <i>protein p62</i> , refere-se a proteína p62.
<b>P70S6:</b>	Do inglês <i>P70S6 kinase phosphorylation</i> , traduzido como fosforilação da proteína quinase P70S6.
<b>PB:</b>	Paraíba (Estado brasileiro).
<b>p-mTOR:</b>	Do inglês <i>phospho-mTOR</i> , traduzido como mTOR fosforilada.
<b>QA:</b>	Queilite actínica.
<b>RG:</b>	Do inglês <i>glucocorticoid receptor</i> , traduzido como receptor de glicocorticoide.
<b>RGα:</b>	Do inglês <i>alpha isoform of the glucocorticoid receptor</i> , traduzido como isoforma alfa do receptor de glicocorticoide.
<b>SGHM:</b>	Sistema de gradação histopatológica de malignidade.
<b>SGTA:</b>	Do inglês <i>small glutamine-rich tetratricopeptide</i> , traduzido como tetratricopeptídeo rico em glutamina.
<b>SPSS:</b>	Do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> , traduzido como Pacote estatístico para ciências sociais.
<b>SQSTM1:</b>	Do inglês <i>sequestosome 1</i> , traduzido como sequestossomo 1.
<b>TNM:</b>	Tumor-Nodo-Metástase.
<b>TRIS-HCl:</b>	Do inglês <i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride</i> , traduzido

como Tris-hidroximetil-aminometano cloridrato.

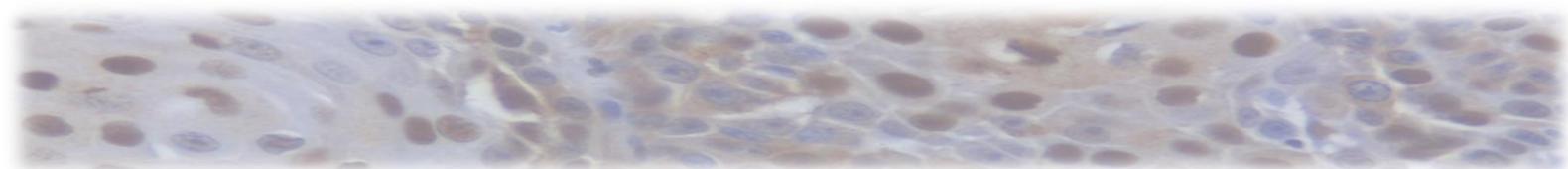
**UEPB:** Universidade Estadual da Paraíba.

**USA:** Do inglês *United States of America*, traduzido como Estados Unidos da América.

**UV:** Ultravioleta.

**UVB:** Ultravioleta B.

**VEGF:** Do inglês *vascular endothelial growth factor*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.

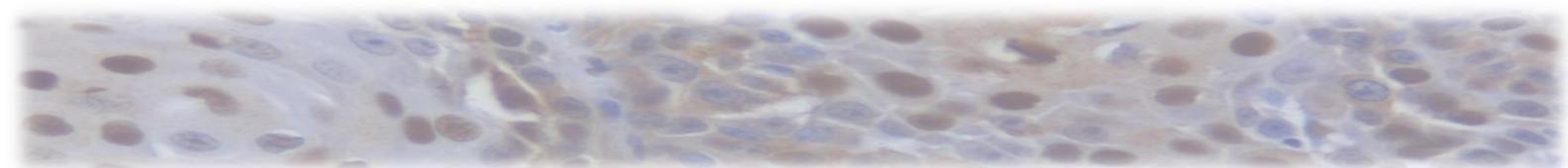


## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

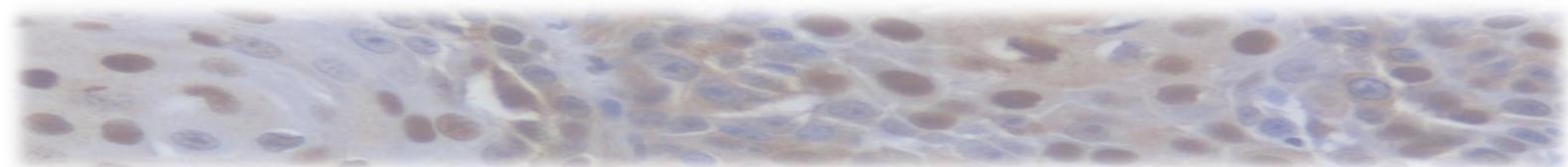
	<b>Página</b>
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b>	
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do processo de autofagia.....	35
<b>METODOLOGIA</b>	
<b>Quadro 1.</b> Elenco de variáveis analisadas no estudo.....	42
<b>Quadro 2.</b> Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	43
<b>Quadro 3.</b> Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	44
<b>Quadro 4.</b> Alterações arquiteturais e citológicas analisadas para o diagnóstico da displasia epitelial e sua classificação de acordo com o grau.....	45
<b>Quadro 5.</b> Sistema de gradação histopatológica de malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne <i>et al.</i> (1992).....	46
<b>Quadro 6.</b> Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo....	48
<b>ARTIGO</b>	
<b>Figura 1.</b> Expressão citoplasmática e nuclear da R $\alpha$ em QA (A) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200 $\times$ ). Imunoexpressão predominantemente citoplasmática da R $\alpha$ em CCELI (B) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200 $\times$ ).....	74
<b>Figura 2.</b> Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de imunopositividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para R $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com os grupos de lesões.....	75
<b>Figura 3.</b> Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de imunopositividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para R $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com o grau de displasia epitelial nas QAs.....	76
<b>Figura 4.</b> Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de imunopositividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para R $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com o grau histopatológico de malignidade nos CCELI .....	77

<b>Figura 5.</b>	Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade citoplasmática para RGA, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao tamanho do tumor (A), metástase linfonodal regional (B) e estágio clínico (C) dos CCELI.....	78
<b>Figura 6.</b>	Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade nuclear para RGA, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao tamanho do tumor (A), metástase linfonodal regional (B) e estágio clínico (C) dos CCELI.....	79
<b>Figura 7.</b>	Expressão citoplasmática de Atg7 em QA (A) e CCE de lábio inferior (B) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×). Expressão citoplasmática e nuclear de LC3A em QA (C) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×). Expressão citoplasmática de LC3A em CCELI (D) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×).....	80
<b>Figura 8.</b>	Expressão citoplasmática e nuclear de p62 em QA (A) e CCELI (B) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×). Expressão citoplasmática de p-mTOR em QA (A) e CCELI (B) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×)..	81



## LISTA DE TABELAS

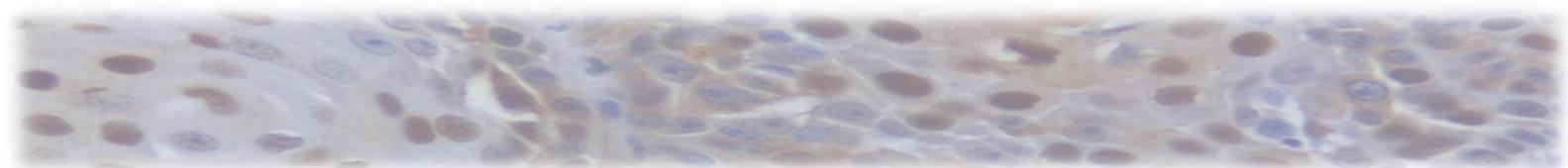
	<b>Página</b>	
<b>Tabela 1.</b>	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	69
<b>Tabela 2.</b>	Distribuição absoluta e relativa dos casos de QA e CCELI de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.....	70
<b>Tabela 3.</b>	Tamanho da amostra, número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (núcleo e citoplasma) para RGA, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de lesões.....	71
<b>Tabela Suplementar 1</b>	Coefficientes de correlação de Spearman ( <i>r</i> ) e respectivas significâncias estatísticas ( <i>p</i> ) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nas QAs.	72
<b>Tabela Suplementar 2</b>	Coefficientes de correlação de Spearman ( <i>r</i> ) e respectivas significâncias estatísticas ( <i>p</i> ) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nos CCELIs.....	73



## SUMÁRIO

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b> 28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b> 39
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b> 39
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b> 39
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b> 41
<b>3.1</b>	<b>Considerações éticas.....</b> 41
<b>3.2</b>	<b>Caracterização do estudo.....</b> 41
<b>3.3</b>	<b>População.....</b> 41
<b>3.4</b>	<b>Amostra.....</b> 41
<b>3.4.1</b>	<b><i>Critérios de inclusão.....</i></b> 41
<b>3.4.2</b>	<b><i>Critérios de exclusão.....</i></b> 42
<b>3.5</b>	<b>Variáveis.....</b> 42
<b>3.6</b>	<b>Estudo clínico.....</b> 43
<b>3.7</b>	<b>Estudo morfológico.....</b> 44
<b>3.8</b>	<b>Estudo imunoistoquímico.....</b> 47
<b>3.8.1</b>	<b><i>Método imunoistoquímico.....</i></b> 47
<b>3.8.2</b>	<b><i>Análise imunoistoquímica.....</i></b> 49
<b>3.9</b>	<b>Análise estatística.....</b> 49
<b>4</b>	<b>ARTIGO.....</b> 52
<b>4.1</b>	<b>Apresentação.....</b> 52
<b>4.2</b>	<b>Artigo a ser submetido.....</b> 53
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b> 82
	<b>REFERÊNCIAS.....</b> 84
	<b>ANEXOS.....</b> 98
	<b>APÊNDICES.....</b> 115



## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna que afeta o lábio, comumente observada em indivíduos do sexo masculino, adultos de meia-idade e idosos de pele clara, causada pela exposição crônica e excessiva à radiação ultravioleta (UV) (VIVIANO; ADDAMO; LORENZINI, 2013; WARNAKULASURIYA, 2018; MELLO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020, VARELA-CENTELLES *et al.*, 2020; SEOANE *et al.*, 2021). A radiação UV é capaz de induzir diversas alterações genótípicas e fenotípicas nas células, resultando em redução da capacidade fotoprotetora do lábio e atrofia epitelial (RON, 1998; SAVAGE; MCKAY; FAULKNER, 2010). A prevalência de QA em populações expostas cronicamente à radiação UV, como pescadores e trabalhadores rurais e da construção civil, pode variar de 11,4% a 39,6% (JUNQUEIRA *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-BLANCO *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ-BLANCO *et al.*, 2019).

Clinicamente, a QA pode ser caracterizada como aguda ou crônica (DE SOUZA LUCENA *et al.*, 2012; VIVIANO; ADDAMO; LORENZINI, 2013). A QA aguda, menos frequente e identificada em indivíduos expostos à radiação UV por um curto período, se caracteriza por lábios avermelhados e edemaciados, com subsequente formação de bolhas e crostas. A QA crônica, diagnosticada em indivíduos expostos cronicamente à radiação UV, é caracterizada por atrofia do vermelhão do lábio, associada à perda de elasticidade, com formação de placas ceratóticas que variam de delgadas a espessas. Tais placas ceratóticas podem se sobrepor de forma irregular a áreas eritematosas, fissuradas ou ulceradas (DE SOUZA LUCENA *et al.*, 2012; WARNAKULASURIYA, 2018; MUSE; CRANE, 2021). A alteração da borda do vermelhão do lábio e a perda de nitidez da interface entre a semimucosa labial e a pele é outro achado clínico comum (MARKOPOULOS *et al.*, 2004; WARNAKULASURIYA, 2018; MUSE; CRANE, 2021).

Quanto às características histopatológicas das QAs, podem ser observadas alterações tanto no componente epitelial como no tecido conjuntivo. O tecido epitelial demonstra atrofia e hiperqueratose em graus variados e pode apresentar áreas de displasia (DOS SANTOS *et al.*, 2003; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008, WARNAKULASURIYA, 2018; MUSE; CRANE, 2021). O tecido conjuntivo subjacente revela áreas basofílicas amorfas, denominadas de elastose solar, que resultam da degeneração das fibras colágenas. Além disso, podem ser observadas áreas de vasodilatação e infiltrado inflamatório de intensidade variável (MARKOPOULOS *et al.*, 2004; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; WARNAKULASURIYA, 2018; MUSE; CRANE, 2021).

As displasias epiteliais se caracterizam pela associação de alterações arquiteturais e citológicas. Embora sejam reconhecidos diversos critérios morfológicos para o diagnóstico da displasia epitelial, a identificação das manifestações iniciais deste processo constitui um verdadeiro desafio (GALE *et al.*, 2005; REIBEL *et al.*, 2017). Além da dificuldade na identificação das alterações iniciais, a gradação das displasias epiteliais constitui um processo complexo (GALE *et al.*, 2005; CAMARA *et al.*, 2016; REIBEL *et al.*, 2017).

A displasia epitelial oral tem sido classificada, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), quanto ao grau de severidade. Um dos principais parâmetros utilizados para sua gradação é o número de terços do revestimento epitelial com alterações citológicas ou arquiteturais (GALE *et al.*, 2005; REIBEL *et al.*, 2017). A displasia leve é caracterizada por alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio, ou que se estendem ao terço médio, acompanhadas de mínima atipia citológica. A displasia epitelial moderada é representada por atipias citológicas em quantidade moderada e alterações arquiteturais que se estendem até o terço médio do epitélio. Por sua vez, alterações arquiteturais que se estendem até o terço superior do epitélio, acompanhadas de grandes atipias citológicas, ou que se limitam ao terço médio do epitélio e são acompanhadas por marcantes atipias citológicas, caracterizam a displasia epitelial severa (GALE *et al.*, 2005; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008; REIBEL *et al.*, 2017).

Novos parâmetros ou sistemas de gradação para as displasias epiteliais orais tem sido alvo de diversas pesquisas científicas (KUJAN *et al.*, 2006; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008). Nesse contexto, o sistema de gradação binário foi desenvolvido, classificando-as de acordo com o grau de displasia epitelial (KUJAN *et al.*, 2006; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008; REIBEL *et al.*, 2017). Kujan *et al.* (2006) classificaram as displasias epiteliais de acordo com o número de alterações arquiteturais e citológicas. Aquelas que exibissem até três alterações arquiteturais ou até quatro alterações citológicas seriam classificadas como baixo grau. Por sua vez, aquelas que apresentassem ao menos quatro alterações arquiteturais ou cinco alterações citológicas seriam classificadas como alto grau de displasia epitelial. Numa tentativa de simplificar o sistema binário e melhorar a concordância entre os examinadores, Warnakulasuriya *et al.* (2008) propuseram uma adaptação, no qual as lesões sem displasia ou com displasia leve seriam classificadas como de baixo grau e aquelas com displasias moderadas ou severas seriam classificadas como de alto grau.

Diversas condutas terapêuticas têm sido propostas para o tratamento das QAs, as quais incluem procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos. Dentre os procedimentos cirúrgicos, podem ser destacadas a crioterapia, a eletrocirurgia, a ablação por laser de dióxido de carbono

e a vermelhectomia. No âmbito das terapias não cirúrgicas, podem ser mencionados o uso de retinoides tópicos, creme de 5-fluorouracilo, creme de imiquimod, anti-inflamatórios, corticoides e terapia fotodinâmica (SAVAGE; MCKAY; FAULKNER, 2010; LOPES *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2020, BAKIRTZI *et al.*, 2021).

Pesquisas têm revelado que o desenvolvimento da QA e a sua eventual progressão para um CCE podem envolver alterações na proliferação e diferenciação celulares (CORREA *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2015; CHRUN *et al.*, 2017), no reparo do DNA (LOPES *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2020), nas respostas imunes (GONÇALVES *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2019; SENA *et al.*, 2019) e na apoptose (LEITE *et al.*, 2016; CHRUN *et al.*, 2017; SENA *et al.*, 2018). Embora aproximadamente 10% a 30% dos casos de QA sofram transformação para um carcinoma de células escamosas (CCE) (DOS SANTOS *et al.*, 2003; OLIVEIRA ALVES *et al.*, 2014, LAI *et al.*, 2020), os eventos moleculares envolvidos neste processo ainda não são completamente conhecidos (SENA *et al.*, 2018).

O CCE de lábio é uma neoplasia maligna frequente no complexo oral (MARUCCIA *et al.*, 2012; WEATHERSPOON *et al.*, 2015; KERAWALA *et al.*, 2016; EL-NAGGAR *et al.*, 2017), que tem como principal fator de risco para o seu desenvolvimento a exposição à radiação UV, principalmente à radiação UVB (VANDERLEI *et al.*, 2013; RIO *et al.*, 2013; KERAWALA *et al.*, 2016). A carcinogenicidade da radiação UV está relacionada à formação de dímeros de pirimidina no DNA (BRASILEIRO FILHO, 2016; TOPRANI; KELKAR MANE, 2021). Este tipo de lesão é usualmente corrigido pela via de excisão de nucleotídeos, mas com a exposição solar excessiva, a capacidade desta via de reparo é sobrepajada (KUMAR *et al.*, 2013; TOPRANI; KELKAR MANE, 2021). No entanto, a radiação UVB não é o único fator de risco para o desenvolvimento do CCE de lábio. Fatores socioeconômicos e relacionados ao estilo de vida, como uso de fumo e consumo de bebidas alcoólicas, falhas na vigilância imunológica e susceptibilidade genética podem contribuir para a carcinogênese labial (SOUZA *et al.*, 2011; KERAWALA *et al.*, 2016; TOPRANI; KELKAR MANE, 2021).

Na maioria dos casos, o CCE de lábio é diagnosticado em homens de pele clara, entre a quarta e a sexta décadas de vida, com longo histórico de exposição à luz solar (OLIVEIRA ALVES *et al.*, 2014; OZTURK *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2020). Aproximadamente 90% a 97% dos casos estão localizados no lábio inferior, já que a sua posição anatômica possibilita exposição intensa ao sol em comparação com o lábio superior (SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011; OLIVEIRA ALVES *et al.*, 2014; KERAWALA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020). Entretanto, quando o lábio superior é acometido, estudos sugerem que o

CCE apresente curso clínico mais agressivo (HASSON, 2008). Clinicamente, o CCE de lábio pode se apresentar como uma lesão exofítica, endofítica, úlcero-infiltrativa ou verrucosa (KADEMANI, 2007; ROSEBUSH *et al.*, 2011). O exame físico geralmente revela uma área ulcerada recoberta por crosta, com bordas endurecidas (ROSEBUSH *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2020).

Histopatologicamente, o CCE de lábio é caracterizado por lençóis, ninhos ou cordões invasivos de células neoplásicas com diferenciação escamosa. Individualmente, as células neoplásicas exibem citoplasma eosinofílico abundante e núcleos volumosos, geralmente hiper cromáticos. É possível constatar aumento da relação núcleo/citoplasma, além de graus variados de pleomorfismo celular e nuclear. Tipicamente, podem ser evidenciadas áreas de diskeratose, bem como formação de pérolas córneas. Destacam-se, ainda, graus variados de displasia no epitélio adjacente à lesão (VIEIRA *et al.*, 2012; NEVILLE *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020).

Por estar localizado em uma região de fácil visualização, que permite o diagnóstico precoce, estudos têm reportado taxas de sobrevida em 5 anos para pacientes com CCE de lábio inferior (CCELI) que podem alcançar 90% (SALGARELLI *et al.*, 2009; SARGERAN *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012; OLIVEIRA ALVES *et al.*, 2014; OZTURK *et al.*, 2014; KERAWALA *et al.*, 2016; AGOSTINI *et al.*, 2017). Mesmo assim, em até 26,5% dos casos, é possível identificar metástases regionais ao diagnóstico (VUKADINOVIC *et al.*, 2007; SALGARELLI *et al.*, 2009; SARGERAN *et al.*, 2009; WALTON; CRAMER, 2020), determinando, nestas situações, uma diminuição importante na sobrevida dos pacientes em 5 anos (VUKADINOVIC *et al.*, 2007; SALGARELLI *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012; KERAWALA *et al.*, 2016). Dentre os principais fatores relacionados à sobrevida dos pacientes com CCELI, destacam-se o tamanho do tumor, a metástase em linfonodos regionais e a recorrência da doença (SOUZA *et al.*, 2011; KERAWALA *et al.*, 2016).

O tratamento de escolha para o CCE de lábio é a excisão cirúrgica (MARUCCIA *et al.*, 2012; KERAWALA *et al.*, 2016; KRISTENSEN *et al.*, 2017). Casos com metástase, tanto regional quanto à distância, ou recorrentes podem necessitar de terapia adjuvante com radioterapia (HASSON, 2008; VIVIANO; ADDAMO; LORENZINI, 2013; KERAWALA *et al.*, 2016). O esvaziamento cervical tem sido reportado como eficaz na prevenção de metástases a partir de tumores em estágios iniciais e na eliminação de metástases ocultas (MORSELLI *et al.*, 2007; KERAWALA *et al.*, 2016; YÜCEL *et al.*, 2020).

Com a finalidade de caracterizar as neoplasias malignas, planejar a terapia mais adequada e, assim, estimar tanto a resposta clínica como a sobrevida dos pacientes, há anos o sistema de estadiamento clínico TNM tem sido adotado, com atualizações ao longo dos anos (SOBIN; WITTEKIND, 2002; LINDENBLATT *et al.*, 2012; MOECKELMANN *et al.*, 2018; ALMANGUSH *et al.*, 2020). Tal sistema se baseia na análise de três componentes da neoplasia: T – tamanho/ extensão do tumor primário; N – metástase em linfonodos regionais; e M – metástase à distância. A adição de números a esses três componentes reflete a extensão da doença e a lesão pode ser classificada em T0, T1, T2, T3, T4 | N0, N1, N2, N3 | M0, M1. Após definir as categorias T, N e M, elas são agrupadas em estágios que variam de I a IV (SOBIN; WITTEKIND, 2002; WITTEKIND *et al.*, 2002).

Apesar da grande importância do sistema TNM, a existência de casos diagnosticados em estágios iniciais, tratados corretamente, e que, no entanto, evoluem rapidamente ao óbito, não condizendo com a indicação do sistema de estadiamento clínico, tem suscitado a busca por outros fatores prognósticos (COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005; LOURENÇO *et al.*, 2007; PEURALA *et al.*, 2018). Assim, os sistemas de gradação histopatológica de malignidade (SGHM) para os CCE orais surgiram com o intuito de fornecer conhecimentos adicionais que pudessem explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes. Esse conjunto de informações poderia contribuir para uma melhor determinação do prognóstico e sobrevida dos pacientes, através do delineamento do tratamento adequado para cada caso (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; LOURENÇO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2021).

Broders (1920) foi o primeiro a propor um método para a gradação do CCE oral, que se baseava no grau de diferenciação das células neoplásicas. No entanto, estudos subsequentes constataram um alto índice de discordância entre os examinadores e uma falta de associação entre esse sistema e o prognóstico dos CCEs orais (KRISHNAMURTHI; SHANTA; SASTRI, 1971). Tais observações levaram ao desenvolvimento de vários outros SGHM, como os de Wahi (1971), Fisher (1975), Crissman *et al.* (1984) e Anneroth, Batsakis e Luna (1987).

Dentre esses sistemas, destaca-se o proposto por Bryne *et al.* (1992), que avalia quatro parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, intensidade do infiltrado inflamatório e padrão de invasão. Essa análise é realizada no *front* de invasão tumoral, por constituir uma área onde ocorrem vários eventos moleculares importantes, como angiogênese, perdas e ganhos de moléculas de adesão e secreção de enzimas proteolíticas (BRYNE, 1989; LIMA *et al.*, 2014). Esses parâmetros são classificados em escores que, após somados,

resultam em um escore final de malignidade (BRYNE *et al.*, 1992). Dessa forma, o SGHM pode contribuir para uma melhor determinação do prognóstico e sobrevida dos pacientes, através do delineamento do tratamento adequado para cada caso (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; LOURENÇO *et al.*, 2007; ALMANGUSH *et al.*, 2020).

O SGHM da OMS, que tem como base o sistema proposto por Broders (1920), leva em consideração o grau de diferenciação celular em toda a extensão tumoral (CARDESA *et al.*, 2005). De acordo com este sistema, os CCE orais são classificados em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados. Lesões bem diferenciadas se assemelham ao epitélio escamoso normal, ao passo que lesões moderadamente diferenciadas exibem pleomorfismo nuclear distinto e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas, bem como menor ceratinização. Nos carcinomas pobremente diferenciados, células imaturas predominam, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima ceratinização (CARDESA *et al.*, 2005).

Em um estudo multicêntrico com 311 casos de CCE de língua diagnosticados em estágios iniciais, Almangush *et al.* (2015) propuseram um novo modelo de avaliação histopatológica a partir da análise de dois parâmetros morfológicos combinados (brotamento tumoral e espessura do tumor). Após análise multivariada, os autores encontraram associação estatisticamente significativa entre o alto escore de risco (tumores com espessura maior ou igual a 4 mm e com 5 ou mais brotamentos tumorais no *front* invasivo) e a recorrência locorregional ( $p = 0,033$ ) e morte relacionada à doença ( $p < 0,001$ ). Para Almangush *et al.* (2015), este novo modelo é uma ferramenta de prognóstico promissora que pode ser utilizada na identificação de casos de CCE de língua em estágios iniciais com comportamento biológico mais agressivo.

No contexto do desenvolvimento e da progressão de neoplasias malignas, estudos têm destacado o papel do receptor de glicocorticoide (RG) (ZHAO *et al.*, 2017; SENA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019; GANDHI *et al.*, 2020). O RG é uma proteína da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição dependentes de ligantes que está envolvida na regulação de respostas imunes e inflamatórias, além da proliferação celular e apoptose (ABDULJABBAR *et al.*, 2015; MIHAILIDOU *et al.*, 2016; HU; CHEN, 2017; GANDHI *et al.*, 2020). Dentre as cinco isoformas do RG já identificadas, a alfa (RG $\alpha$ ) se apresenta como a principal responsável pelas atividades transcricionais mediadas por este receptor (GOVINDAN *et al.*, 1985; LU; CIDLOWSKI, 2005).

A alta expressão da RG $\alpha$  tem sido associada a indicadores de comportamento biológico menos agressivo em neoplasias malignas, como menor tamanho tumoral, estágios

clínicos iniciais e maiores taxas de sobrevivência dos pacientes, tanto geral como livre de doença (LU *et al.*, 2006; YAKIREVICH *et al.*, 2011; ABDULJABBAR *et al.*, 2015; GANDHI *et al.*, 2020). Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a RGA é capaz de suprimir a expressão de diversas proteínas, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e ciclooxigenase-2 (COX-2), bem como estimular a expressão de p27, p21 e do inibidor alfa do fator nuclear kappa B ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) (McBETH *et al.*, 2015; SUNDAHL *et al.*, 2016; HU; CHEN, 2017).

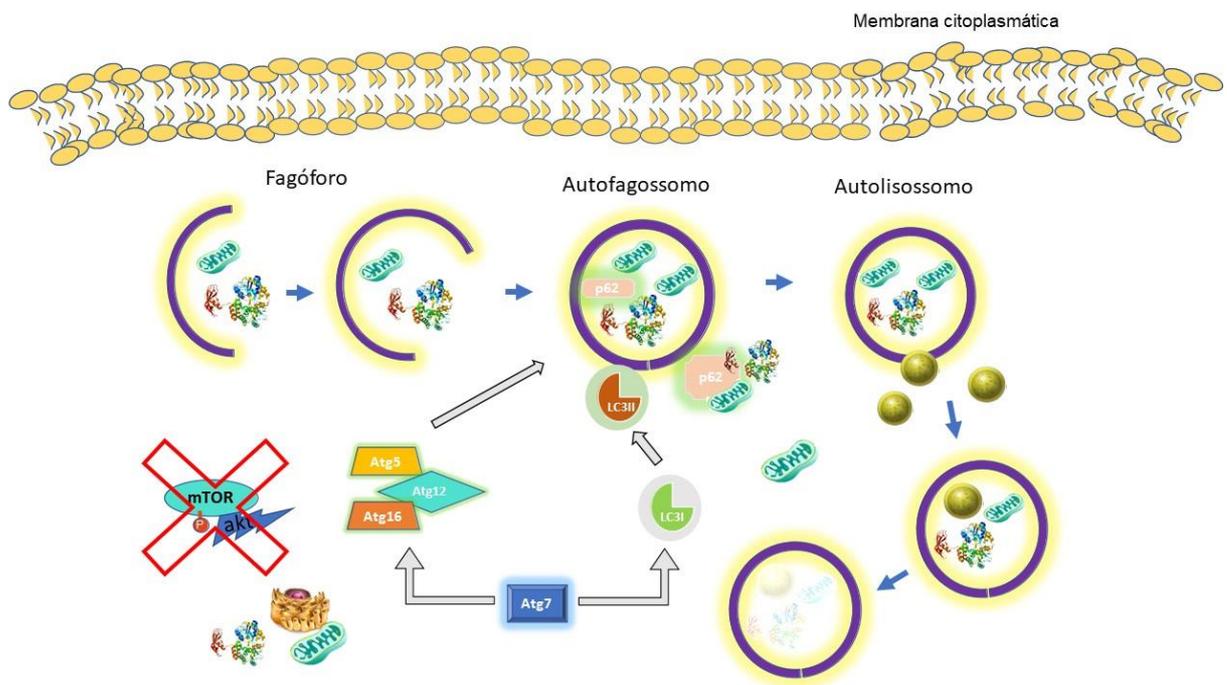
Além dos processos descritos anteriormente, estudos têm revelado o envolvimento dos glicocorticoides e seus receptores na modulação da autofagia (AHN *et al.*, 2014; TRONCOSO *et al.*, 2014; RELIC *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2020; SATO *et al.*, 2020). Investigações com modelos experimentais de autofagia deficiente revelam que os tumores crescem mais rapidamente, sugerindo que a autofagia pode constituir um mecanismo supressor tumoral (LEVINE; KROEMER, 2008). Por outro lado, ao inibir a apoptose induzida pela falta de interações entre células neoplásicas e matriz extracelular, a autofagia pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão tumorais (LEONE; AMARAVADI, 2013). Nesse sentido, dependendo do tipo de célula ou alteração genética associada, a autofagia pode tanto contribuir para a tumorigênese como inibir este processo (LEVINE; KROEMER, 2008; TANG *et al.*, 2013; SAKAKURA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017).

A autofagia estimula a sobrevivência de células tumorais em resposta ao estresse metabólico, especialmente quando há inibição da apoptose, e também diminui a massa mitocondrial e reduz a susceptibilidade das células à apoptose por estímulos mitocondriais (MAYCOTTE; THORBURN, 2011). Assim, é possível que as células tumorais induzam a autofagia para sobreviver ao estresse metabólico no microambiente tumoral e para evitar a apoptose induzida pela terapia antineoplásica. Por outro lado, estudos também sugeriram que a autofagia poderia funcionar como um mecanismo de morte celular, especialmente em células com defeitos na apoptose. Dessa forma, torna-se evidente que a autofagia pode apresentar efeitos diferenciados, dependendo do tipo de célula ou alteração genética associada (AKAR *et al.*, 2008; KOCATURK *et al.*, 2019; LI; HE; MA, 2020).

A autofagia é um processo altamente conservado, coordenado por genes da família *ATG*. As proteínas codificadas a partir desses genes são necessárias durante as diversas etapas do processo autofágico (LEONE; AMARAVADI, 2013). Inicialmente ocorre o processo de nucleação ou iniciação, etapa onde inicia-se o desenvolvimento do fagóforo, uma membrana lipídica dupla que engloba componentes citoplasmáticos para posterior degradação. Em seguida ocorre o fechamento dessa membrana lipídica, formando uma vesícula, denominada

autofagossomo. Este se acopla aos lisossomos, formando o autolisossomo (SCHAAF *et al.*, 2016; GROSS; GRAEF, 2020) (FIGURA 1).

**Figura 1.** Representação esquemática do processo de autofagia.



**Fonte:** Adaptado de Galluzzi *et al.* (2015)

Durante o processo de autofagia, ocorre a expansão da membrana do autofagossomo, que envolve um complexo de proteínas, com destaque para Atg7. Além de estabelecer ligações covalentes com as proteínas Atg5 a Atg12, Atg7 participa da ativação da cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo (LC3), uma importante proteína envolvida na formação dos autofagossomos (GALLUZZI *et al.*, 2015; KOCATURK *et al.*, 2019).

Durante a maturação do autofagossomo, LC3 está presente no meio celular em duas formas: LC3I (citossólica) e LC3II (ligada ao autofagossomo) (CHU *et al.*, 2014). LC3I é clivada e então conjugada com a fosfatidiletanolamina em LC3II, um processo mediado pelas proteínas Atg7 e Atg3 (RABINOWITZ; WHITE, 2010; KLIONSKY *et al.*, 2012). As proteínas Atg7 e Atg10 também promovem a união de Atg12 às proteínas Atg5 e Atg16L1. O complexo formado, em seguida, é direcionado à membrana externa do autofagossomo em

formação (NETEA-MAIER *et al.*, 2015). Dessa forma, a conversão de LC3I para LC3II e a degradação lisossômica de LC3II têm sido utilizadas para monitorar a atividade autofágica (CHU *et al.*, 2014; JIANG; MIZUSHIMA, 2015; KOCATURK *et al.*, 2019).

Três membros da família LC3 ocorrem em humanos: LC3A, LC3B e LC3C, dos quais LC3B é amplamente utilizado como um marcador para autofagia e uma ferramenta para avaliar o fluxo autofágico geral (SCHAAF *et al.*, 2016; KLIONSKY *et al.*, 2016). LC3A e LC3C são sugeridos por terem funções semelhantes a LC3B, mas também podem estar envolvidos em fenômenos não relacionados à autofagia, como transdução de sinal (SUBRAMANI; MALHOTRA, 2013). Entretanto, seu modo de ação molecular preciso permanece desconhecido (BAEKEN *et al.*, 2020).

A proteína p62, também designada sequestossomo 1 (SQSTM1), participa da degradação de proteínas dependente de proteassomos ou lisossomos (SAIYIN *et al.*, 2014). A p62 é incorporada nos autofagossomos por interação direta com LC3II e, posteriormente, degradada durante o processo de autofagia (SAIYIN *et al.*, 2014; LAMARK *et al.*, 2017). Quando a autofagia é inibida, a p62 se acumula no interior da célula. Por outro lado, quando há indução da autofagia, observa-se redução nos níveis intracelulares de p62 (RACOMA *et al.*, 2013; JIANG; MIZUSHIMA, 2015). Dessa forma, a proteína p62 tem sido sugerida como um marcador para avaliar o fluxo autofágico (KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012; JIANG; MIZUSHIMA, 2015; LAMARK *et al.*, 2017).

Outro componente importante no processo de autofagia é a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (DURAN *et al.*, 2011). A mTOR é uma serina-treonina quinase observada em dois complexos proteicos citoplasmáticos: complexo mTOR sensível à rapamicina (proteínas mTOR, GβL e Raptor) e complexo mTOR insensível à rapamicina (proteínas mTOR, GβL e Rictor) (YOON, 2017). A principal função da mTOR é atuar como sensor dos níveis de ATP e aminoácidos, coordenando o balanço e a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento celular (DENNIS *et al.*, 2001; YANG; KLIONSKY, 2010). Quando a autofagia e a síntese proteica são ativadas, Akt fosforila a proteína mTOR (p-mTOR) no sítio de ativação Ser2448. Uma vez ativada, p-mTOR inibe o processo autofágico e ativa a proteína p70S6, uma quinase ativada por sinalização mitogênica importante para o crescimento celular (APPUHAMY *et al.*, 2014).

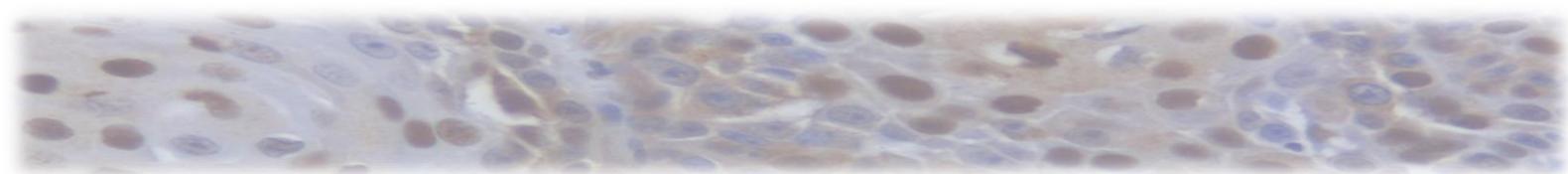
Investigações científicas enaltecem a importância da RGA e da autofagia na regulação do desenvolvimento e progressão de diversas neoplasias malignas, incluindo o CCE oral (DE LIMA *et al.*, 2017; TERABE *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2019; PEÑA-OYARZÚN *et al.*, 2020). Por outro lado, até o momento, pouco se sabe sobre a participação da RGA e da

autofagia na carcinogênese labial. Merecem destaque, nesse cenário, os trabalhos desenvolvidos por Sena *et al.* (2018) e Liu *et al.* (2018).

Sena *et al.* (2018) analisaram as imunorexpressões de  $RG\alpha$ , BAX e BCL-2 em 22 casos de QA e 44 casos de CCELI. Foram observados altos percentuais de positividade para  $RG\alpha$  nas células epiteliais, tanto nas QAs como nos CCELI. Comparadas aos CCEs, as QAs revelaram menor percentual de positividade citoplasmática ( $p < 0,05$ ) e maior percentual de expressão nuclear para  $RG\alpha$  ( $p < 0,05$ ). Nas QAs e nos CCELI, as imunorexpressões de BAX e BCL-2 não apresentaram correlações estatisticamente significativas com a imunorexpressão de  $RG\alpha$  ( $p > 0,05$ ). De acordo com Sena *et al.* (2018), os resultados obtidos sugerem um papel importante para a  $RG\alpha$  na carcinogênese labial, o qual parece não envolver a modulação das expressões das proteínas BCL-2 e BAX.

O estudo desenvolvido por Liu *et al.* (2018), utilizando microarranjos teciduais e ensaios de viabilidade e invasão celulares, avaliou marcadores de autofagia (LC3B e p62) em casos de CCEs localizados em mucosa jugal ( $n = 181$ ), língua ( $n = 244$ ) e lábio ( $n = 72$ ). Os autores observaram maiores níveis de expressão citoplasmática de LC3B e p62 nos CCEs em comparação aos tecidos normais adjacentes. Para todos os grupos de CCEs, não foram observadas diferenças significativas nas imunorexpressões de LC3B em relação ao tamanho do tumor, à metástase regional ou ao estágio clínico. Em relação à p62, os autores identificaram maior expressão em casos com metástase regional nos CCEs localizados em mucosa jugal ( $p < 0,05$ ). Foram identificadas menores taxas de sobrevida em pacientes com CCEs de mucosa jugal e CCEs de lábio que apresentavam alta coexpressão de LC3B e p62 ( $p < 0,05$ ). Além disso, em linhagens celulares de CCE de mucosa jugal, o silenciamento de *LC3B* e *P62* resultou em redução da autofagia e da proliferação e invasão celulares, bem como em aumento dos efeitos citotóxicos do paclitaxel sobre esferas tumorais. De acordo com os autores, esses resultados sugerem que LC3B e p62 podem modular a autofagia para promover a tumorigênese e a quimiorresistência no CCE oral.

Os importantes resultados obtidos por Sena *et al.* (2018) e Liu *et al.* (2018) enaltecem a necessidade de novas investigações sobre a autofagia e os receptores de glicocorticoide na carcinogênese labial, explorando suas potenciais inter-relações. Dessa forma, o presente estudo se propôs a avaliar a imunorexpressão da  $RG\alpha$  e de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em casos de QA e CCELI. Pretendeu-se, com esta pesquisa, contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese labial.



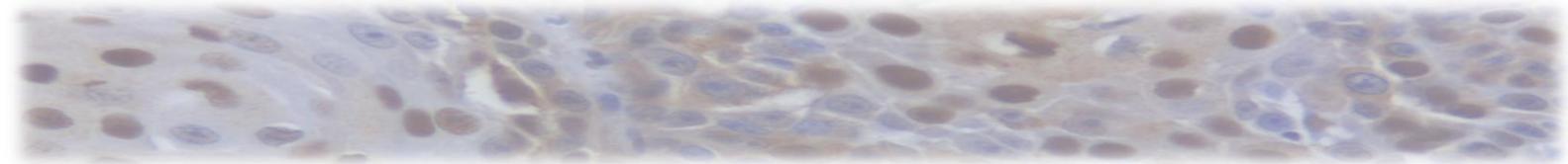
## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a imunexpressão da  $RG\alpha$  e de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em casos de QA e CCELI.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar a presença de displasia epitelial nos casos de QA e classificá-los de acordo com o grau de displasia;
- Determinar o grau histopatológico de malignidade nos casos de CCELI;
- Analisar e estabelecer os percentuais de células epiteliais imunopositivas para as proteínas  $RG\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nos casos de QA e CCELI;
- Relacionar as imunexpressões das proteínas  $RG\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nos CCELI com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico);
- Relacionar as imunexpressões das proteínas  $RG\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR com o grau de displasia epitelial das QAs e com o grau histopatológico de malignidade dos CCELI;
- Verificar possíveis correlações entre as imunexpressões epiteliais das proteínas  $RG\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nos casos de QA e CCELI.



## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Considerações éticas**

O presente estudo foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil), respeitando a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, e submetido à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). O protocolo foi aprovado, conforme parecer nº 3.175.815/ CAAE nº 08340819.9.0000.5187 (ANEXO A).

### **3.2 Caracterização do estudo**

O estudo consistiu em uma pesquisa observacional analítica caracterizada pelo registro e quantificação das imunoexpressões das proteínas RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em casos de QA e CCELI.

### **3.3 População**

A população do estudo foi composta por todos os casos de QA arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB/ Campina Grande – PB, no período de 2011 a 2020, bem como por todos os casos de CCELI arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no período de 2006 a 2017.

### **3.4 Amostra**

A amostra foi selecionada por meio de técnica de amostragem do tipo não probabilista, por conveniência, totalizando 40 casos de QA e 40 casos de CCELI, todos emblocados em parafina.

#### ***3.4.1 Critérios de inclusão***

Foram incluídos na amostra, apenas casos de QA e CCE localizados em lábio inferior. Especificamente para as QAs, foram selecionados casos que demonstravam, ao exame

histopatológico, áreas de elastose solar. Em relação aos CCELI, foram selecionados casos tratados por excisão cirúrgica, que permitiram a avaliação do *front* de invasão tumoral. Além disso, foram incluídos no estudo, apenas casos de CCELI cujos prontuários dos pacientes continham as seguintes informações clínicas: tamanho do tumor, metástases linfonodais regionais, metástases à distância e estágio clínico.

### 3.4.2 Critérios de exclusão

Os casos de QA e CCELI com quantidades insuficientes de material biológico, para realização dos estudos morfológicos e imunoistoquímicos, foram excluídos deste estudo. Em relação às QAs, foram excluídas as lesões de pacientes submetidos previamente à terapia com creme à base de vitaminas ou corticosteroide tópico. Para o grupo dos CCELI, foram excluídos os casos provenientes de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia.

### 3.5 Variáveis

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

**Quadro 1.** Elenco de variáveis analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
Tipo de lesão	Classificação da lesão considerando os achados histopatológicos	QA CCE	Independente (Categórica)
Tamanho do tumor	Tamanho/extensão do tumor primário	T1 T2 T3 T4	Independente (Categórica)
Metástase linfonodal regional	Presença/ausência de metástase em linfonodos regionais	N0 N1 N2 N3	Independente (Categórica)
Metástase à distância	Presença/ausência de metástase à distância	M0 M1	Independente (Categórica)

Estágio clínico	Classificação do CCE considerando o tamanho do tumor (T), a metástase regional (N) e a metástase à distância (M)	Estágio 0 Estágio I Estágio II Estágio III Estágio IV	Independente (Categórica)
Grau histopatológico de malignidade	Classificação histopatológica do tumor na área mais invasiva do CCE	Baixo grau Alto grau	Independente (Categórica)
Grau de displasia epitelial	Classificação histopatológica da QA considerando a ausência/presença e o grau de displasia epitelial	Baixo grau Alto grau	Independente (Categórica)
RG $\alpha$	Percentual de células epiteliais imunopositivas	Citoplasma Núcleo	Dependente (Quantitativa)
Atg7	Percentual de células epiteliais imunopositivas	Citoplasma Núcleo	Dependente (Quantitativa)
LC3A	Percentual de células epiteliais imunopositivas	Citoplasma Núcleo	Dependente (Quantitativa)
p62	Percentual de células epiteliais imunopositivas	Citoplasma Núcleo	Dependente (Quantitativa)
p-mTOR	Percentual de células epiteliais imunopositivas	Citoplasma Núcleo	Dependente (Quantitativa)

### 3.6 Estudo clínico

Informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como sobre a localização anatômica das lesões, foram coletadas a partir de fichas de requisição de exame histopatológico e de prontuários médicos. Nos casos de CCELI, informações sobre o tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico foram obtidas e transcritas para uma ficha específica (APÊNDICE A). Para a coleta desses últimos dados, foram utilizados os parâmetros elencados na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002), os quais se apresentam dispostos nos Quadros 2 e 3.

**Quadro 2.** Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

TAMANHO/ EXTENSÃO DO TUMOR PRIMÁRIO (T)	
<b>TX</b>	O tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário

<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>T2</b>	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
<b>T3</b>	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
<b>T4a</b>	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz)
<b>T4b</b>	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna
<b>METÁSTASE EM LINFONODO REGIONAL (N)</b>	
<b>NX</b>	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástase em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>N2</b>	N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
	N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
	N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>N3</b>	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>METÁSTASE À DISTÂNCIA (M)</b>	
<b>MX</b>	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância
<b>M1</b>	Metástase à distância

**Quadro 3.** Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

<b>ESTÁGIO</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO TNM</b>
Estágio 0	Tis N0 M0
Estágio I	T1 N0 M0
Estágio II	T2 N0 M0
Estágio III	T1, T2 N1 M0
	T3 N0, N1 M0
Estágio IVA	T1, T2, T3 N2 M0
	T4a N0, N1, N2 M0

Estágio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estágio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

### 3.7 Estudo morfológico

A partir do material biológico, fixado em formol a 10% e incluído em parafina, foram obtidos cortes teciduais com 5µm de espessura. Em seguida, esses cortes teciduais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina com hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados e sem conhecimento dos dados clínicos relacionados aos casos, realizaram as análises morfológicas.

Com base nos aspectos arquiteturais e citológicos descritos pela OMS (GALE *et al.*, 2005), os espécimes de QA foram analisados em relação à presença e ao grau de displasia epitelial (QUADRO 4). Em sequência, considerando as recomendações da OMS (GALE *et al.*, 2005) e de Warnakulasuriya *et al.* (2008), os casos de QA foram classificados em: sem displasia, displasia leve, displasia moderada e displasia severa (QUADRO 4).

**Quadro 4.** Alterações arquiteturais e citológicas analisadas para o diagnóstico da displasia epitelial e sua classificação de acordo com o grau.

Alterações avaliadas no diagnóstico da displasia epitelial	
Arquiteturais	Citológicas
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal no tamanho do núcleo (anisonucleose)
Perda de polaridade das células basais	Variação anormal na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)
Projeções epiteliais em forma de gota	Variação anormal no tamanho da célula (anisocitose)
Aumento do número de figuras de mitose	Variação anormal na forma da célula (pleomorfismo celular)
Mitoses superficiais anormais	Aumento da relação núcleo/citoplasma
Disceratose (ceratinização pré-matura em células individuais)	Aumento do tamanho nuclear

Pérolas de ceratina no interior das cristas epiteliais	Figuras atípicas de mitose
	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
	Hipercromatismo
Classificação da displasia epitelial	
Grau	Características
Leve	Alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio, ou que se estendem ao terço médio, acompanhadas de mínima atipia citológica.
Moderada	Alterações arquiteturais estendem-se até o terço médio do epitélio, acompanhadas de atipias citológicas em quantidade moderada.
Severa	Alterações arquiteturais em mais de 2/3 do epitélio, acompanhadas de atipias citológicas, ou que se estendem ao terço médio do epitélio e são acompanhadas por marcantes atipias citológicas.

Fonte: Adaptado de Gale *et al.* (2005) e Warnakulasuriya *et al.* (2008).

Posteriormente, os casos foram classificados quanto ao grau de displasia epitelial, utilizando o sistema binário de gradação inicialmente idealizado por Kujan *et al.* (2006), com posteriores modificações propostas por Warnakulasuriya *et al.* (2008). Os casos de QA sem displasia epitelial ou com displasia leve foram classificados como de baixo grau e os casos com displasia moderada ou severa foram classificados como de alto grau. Os dados provenientes das análises morfológicas das QAs foram transcritos para uma ficha específica (APÊNDICE B).

Nos CCELI, o grau histopatológico de malignidade foi determinado com base no sistema proposto por Bryne *et al.* (1992) (QUADRO 5). Os escores atribuídos a cada um dos aspectos morfológicos das lesões, analisados no *front* de invasão tumoral, foram somados para se obter o escore final de malignidade do caso. As lesões que obtiveram escore final menor ou igual a 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade e os tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA *et al.*, 2007). Os dados obtidos com as análises morfológicas das CCELI foram anotados em uma ficha específica (APÊNDICE C).

**Quadro 5.** Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne *et al.* (1992).

Aspectos morfológicos	Escore de malignidade			
	1	2	3	4

<b>Grau de Ceratinização</b>	Alto (> 50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Baixo (>5<20% das células)	Ausente (0-5% das células)
<b>Pleomorfismo Nuclear</b>	Pouco (>75% de células maduras)	Moderado (50-75% de células maduras)	Intenso (>25<50% de células maduras)	Extremo (0 a 25% de células maduras)
<b>Padrão de Invasão</b>	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

### 3.8 Estudo imunoistoquímico

#### 3.8.1 Método imunoistoquímico

Cortes teciduais com 3µm de espessura foram obtidos, a partir do material biológico emblocado em parafina, e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, os cortes histológicos foram submetidos ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), utilizando anticorpos policlonais anti-RGα e anti-LC3A e anticorpos monoclonais anti-Atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR (QUADRO 6).

Células endoteliais presentes nos cortes histológicos de QA e CCELI foram utilizadas como controle interno positivo para o anticorpo anti-RGα. Por sua vez, cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória foram utilizados como controle positivo para os anticorpos anti-Atg7, anti-LC3A, anti-p62 e anti-p-mTOR. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo 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 6);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (*EnVision Flex antibody diluent*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a 4°C em câmara úmida;
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário (*Ampliflier*, 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);
- ⇒ 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 Harris, à temperatura ambiente (1,5 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 6.** Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone/ referência	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
RG $\alpha$ *	P20	Santa Cruz Biotechnology	1:200	<i>Trilogy</i> , pH 6,0 <i>Pascal</i> , 121°C, 3 min	60 minutos
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	1:600	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:300	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	<i>Overnight</i>

\*Para este anticorpo, a desparafinização, a reidratação e a recuperação antigênica foram realizadas em etapa única, com uso da solução *Trilogy* (Cell Marque™, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### 3.8.2 Análise imunoistoquímica

Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), os cortes histológicos submetidos ao método da imunoperoxidase foram analisados por duas examinadoras previamente treinadas. Para as análises imunoistoquímicas, foi realizado o mascaramento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. As imunorexpressões das proteínas RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram analisadas, separadamente, no citoplasma e no núcleo das células epiteliais das lesões. Nas QAs, a imunorexpressão dessas proteínas foi avaliada em toda a extensão do revestimento epitelial. Nos casos de CCELI, as expressões de RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram analisadas

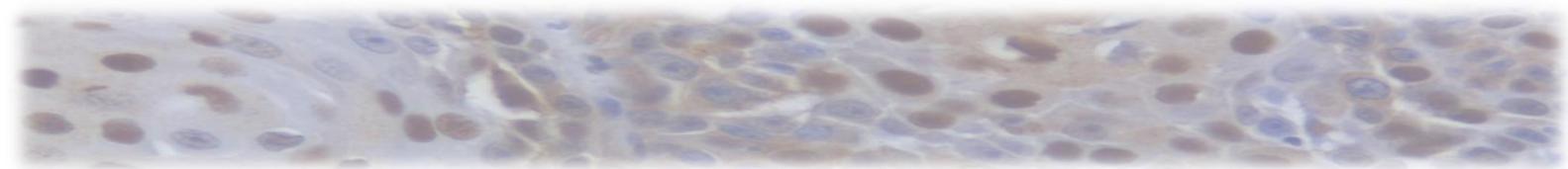
no *front* de invasão tumoral. Considerou-se, como positividade, a coloração acastanhada independentemente de sua intensidade.

Adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Moreno-Galindo *et al.* (2014), foi realizada uma análise quantitativa da imunexpressão das proteínas RGA, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR. Sob aumento de 100×, foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade nos CCELI e 5 campos de maior imunorreatividade nos casos de QA. Em seguida, sob aumento de 400×, cada um desses campos foi fotomicrografado (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa ImageJ® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das células imunomarcadas e das células negativas. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se, por fim, o percentual de células imunopositivas.

### 3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Para caracterização da amostra, foi empregada estatística descritiva. Os dados provenientes das análises das imunexpressões de RGA, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Desse modo, comparações entre as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos e aos diversos parâmetros clinicopatológicos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Por sua vez, correlações entre as imunexpressões de RGA, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram avaliadas por meio do teste de Spearman.

Devido ao pequeno número de casos exibindo imunorreatividade em núcleo, com baixos percentuais de positividade, os dados referentes à expressão das proteínas Atg7 e p-mTOR foram submetidos apenas à análise descritiva. Pelas mesmas razões, os dados provenientes da expressão nuclear de LC3A nos CCELI também foram analisados apenas por meio de estatística descritiva. Para todos os testes estatísticos, 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: **“Análise da imunexpressão da isoforma alfa do receptor de glicocorticoide e de proteínas relacionadas à autofagia na carcinogênese labial”**.

O referido artigo será submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine* (ISSN: 1600-0714, Fator de impacto: 4.253, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

## 4.2 Artigo a ser submetido

### **Análise da imunexpressão da isoforma alfa do receptor de glicocorticoide e de proteínas relacionadas à autofagia na carcinogênese labial**

Título breve: **RG $\alpha$  e proteínas relacionadas à autofagia na carcinogênese labial**

Luana Samara Balduino de Sena<sup>1</sup>, Christany Rodrigues Ferreira<sup>1</sup>; Éricka Janine Dantas da Silveira<sup>2</sup>, Pollianna Muniz Alves<sup>1</sup>, Cassiano Francisco Weege Nonaka<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 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 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

**Abstract**

**BACKGROUND:** Actinic cheilitis (AC) is a disorder of the lip that can progress to squamous cell carcinoma (SCC), but the mechanisms involved in this process are not fully understood. This study analyzed the immunoexpression of alpha isoform of glucocorticoid receptor (GR $\alpha$ ) and autophagy-related proteins (Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR) in AC and lower lip SCC (LLSCC).

**METHODS:** Forty ACs and 40 LLSCCs were selected. The percentages of nuclear and cytoplasmic staining for GR $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR in epithelial cells were assessed and correlated with clinicopathological parameters.

**RESULTS:** Cytoplasmic and nuclear expression of GR $\alpha$  were observed in all cases. Compared to ACs, LLSCCs revealed higher cytoplasmic positivity ( $p < 0.001$ ) and lower nuclear expression for GR $\alpha$  ( $p = 0.021$ ). Higher cytoplasmic expression of GR $\alpha$  was observed in high-grade LLSCCs when compared to low-grade tumors ( $p = 0.016$ ). Regarding autophagy-related proteins, ACs exhibited higher cytoplasmic expression of LC3A ( $p < 0.001$ ), p62 ( $p = 0.003$ ), and p-mTOR ( $p < 0.001$ ) when compared to LLSCCs. In addition, low-grade ACs exhibited higher nuclear expression of LC3A when compared to high-grade ACs ( $p = 0.004$ ). In ACs and LLSCCs, positive correlations were found between nuclear and cytoplasmic immunoexpressions for all proteins analyzed ( $p < 0.05$ ). Moreover, in LLSCCs and ACs, positive correlations were observed among the immunoexpressions of autophagy-related proteins ( $p < 0.05$ ). For both groups, no significant correlations were found between the expression of GR $\alpha$  and autophagy-related proteins ( $p > 0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** Reduced nuclear translocation of GR $\alpha$  and upregulation of autophagy may be important events in lip carcinogenesis, but are not involved in LLSCC progression. In this process, the role of GR $\alpha$  may not be primarily related to modulations in the expression of Atg7, LC3A, p62, or p-mTOR proteins.

**Keywords:** actinic cheilitis; squamous cell carcinoma; glucocorticoid receptors; autophagy; immunohistochemistry.

## Introdução

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna do lábio, resultante da exposição crônica e excessiva à radiação ultravioleta (UV),<sup>1,2</sup> que pode representar uma fase inicial da carcinogênese labial.<sup>3</sup> Aproximadamente 10% a 30% dos casos de QA sofrem transformação para um carcinoma de células escamosas (CCE).<sup>4,5</sup> O CCE de lábio inferior (CCELI) representa uma das neoplasias malignas mais comuns da cavidade oral. Por estar localizado em uma região de fácil visualização, estudos têm reportado taxas de sobrevida em 5 anos para pacientes com CCELI que podem alcançar 90%.<sup>6,7</sup> Dessa forma, uma melhor compreensão dos processos biológicos e moleculares no que diz respeito ao desenvolvimento da QA e a sua eventual progressão para um CCELI faz-se necessária.<sup>8</sup>

Nesse contexto, tem sido reconhecida a participação do receptor de glicocorticoide (RG) na tumorigênese de neoplasias malignas diversas.<sup>8-10</sup> O RG constitui um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição dependentes de ligantes que, após a ativação pelo seu ligante, esse receptor pode atuar na regulação positiva ou negativa de genes-alvo específicos como STAT3, STAT5 e NFκB.<sup>11,12</sup> Dentre as isoformas já identificadas do RG, a alfa (RGα) se apresenta como isoforma funcional, bem como a principal responsável pelas atividades transcricionais mediadas por este receptor.<sup>11,12</sup>

Estudos têm revelado o envolvimento dos glicocorticoides e seus receptores na modulação da autofagia. Troncoso *et al.*<sup>13</sup> observaram que a dexametasona era capaz de estimular a ativação precoce da autofagia dependente da proteína quinase, AMPK e da atividade dos receptores de glicocorticoides. A autofagia representa um processo altamente conservado, coordenado por genes da família *ATG*, no qual as células degradam seus próprios componentes citoplasmáticos dentro de vacúolos autofágicos, regulando seu volume e utilizando os produtos derivados desta degradação para sua sobrevivência.<sup>14-16</sup>

Durante o processo de autofagia, ocorre a expansão da membrana do autofagossomo, que envolve um complexo de proteínas, com destaque para Atg7. Além de estabelecer ligações covalentes com as proteínas Atg5 e Atg12, Atg7 participa da ativação da cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo (LC3), uma importante proteína envolvida na formação dos autofagossomos.<sup>17,18</sup> Três membros da família LC3 tem sido descritos em humanos: LC3A, LC3B e LC3C, cujas funções estão primariamente relacionadas a autofagia.<sup>19,20</sup> Outros papéis não autofágicos são sugeridos para LC3A, que podem estar envolvidas na via de transdução de sinais.<sup>21</sup> Outra proteína que merece destaque é a p62, esta é incorporada nos autofagossomos por interação direta com LC3II e, posteriormente, degradada durante o processo de autofagia.<sup>22</sup> Além disso, p62 é uma parte integral do

complexo da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR),<sup>23</sup> molécula-chave na regulação da autofagia.<sup>15,16</sup> Quando a autofagia e a síntese proteica são ativadas, Akt fosforila a proteína mTOR (p-mTOR) no sítio de ativação Ser2448. Uma vez ativada, p-mTOR inibe o processo autofágico.<sup>15,16,24</sup>

Investigações com modelos experimentais de autofagia deficiente revelam que os tumores crescem mais rapidamente, sugerindo que a autofagia é um mecanismo supressor tumoral.<sup>15,25</sup> Por outro lado, ao inibir a apoptose induzida pela falta de interações entre células neoplásicas e matriz extracelular, a autofagia pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão tumorais.<sup>14,25</sup> Nesse sentido, dependendo do tipo de célula ou alteração genética associada, a autofagia pode tanto contribuir para a tumorigênese como inibir este processo.<sup>15,25,26</sup>

Apesar do importante papel sugerido para a  $RG\alpha$ , até o momento, pouco se sabe sobre a participação da  $RG\alpha$  e da autofagia na carcinogênese labial. Neste contexto, um estudo recentemente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa analisou as imunorexpressões de  $RG\alpha$ , BAX e BCL-2 em casos de QA e CCELI, sugerindo um papel importante da  $RG\alpha$  na carcinogênese labial, o qual parece não envolver a modulação das expressões dessas proteínas relacionadas à apoptose.<sup>8</sup>

O estudo proposto por Liu *et al.*<sup>27</sup> avaliou marcadores de autofagia (LC3B e p62) em casos de CCEs localizados em mucosa jugal, língua e lábio. Foram identificadas maiores expressões de p62 em casos com metástase regional nos CCEs localizados em mucosa jugal e menores sobrevividas de doença específica em pacientes com CCEs de mucosa jugal e CCEs de lábio que apresentavam alta coexpressão de LC3B e p62. De acordo com os autores, esses resultados sugerem que LC3B e p62 podem modular a autofagia para promover a tumorigênese e a quimiorresistência no CCE oral.

Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a imunorexpressão da  $RG\alpha$  e de proteínas envolvidas na autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) em casos de QA e de CCELI. Pretendeu-se, com este estudo, contribuir com mais esclarecimentos a respeito dos mecanismos envolvidos na carcinogênese labial.

## **Material e métodos**

### *Espécimes*

Para esta pesquisa, foram selecionados 40 casos de QA e 40 casos de CCELI, obtidos no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) / Campina Grande – PB e no Serviço de Anatomia Patológica do

Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, Brasil, respectivamente. Para as QAs, foram incluídos na amostra apenas os casos que demonstravam áreas de elastose solar. Em relação aos CCELI, foram selecionados apenas os casos tratados por excisão cirúrgica, cujos prontuários dos pacientes continham informações a respeito do tamanho do tumor, metástases linfonodais regionais, metástases à distância e estágio clínico. Para o estadiamento clínico dos CCELI, as informações foram coletadas com base na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos.<sup>28</sup> Casos de QA previamente tratadas com creme à base de vitaminas ou corticosteroide tópico foram excluídos do estudo. Além disso, foram excluídos da pesquisa os casos de CCELI provenientes de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia. Para todos os casos, foram coletadas informações relativas ao sexo, idade dos pacientes e localização anatômica das lesões. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEPB (Protocolo: nº 3.175.815/ CAAE nº 08340819.9.0000.5187).

#### *Análise morfológica*

Do material biológico emblocado em parafina, cortes teciduais com 5µm de espessura foram obtidos, estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados e sem conhecimento dos dados clínicos relacionados aos casos, realizaram as análises morfológicas. Com base nos aspectos arquiteturais e citológicos e nas recomendações propostas pela OMS<sup>29</sup> e por Warnakulasuriya *et al.*,<sup>30</sup> as QAs foram analisadas quanto à presença e ao grau de displasia epitelial. Em sequência, utilizando-se um sistema binário de gradação,<sup>30,31</sup> os casos foram classificados em QA de baixo grau (sem displasia ou displasia epitelial leve) ou QA de alto grau (displasia moderada ou displasia severa).

Nos CCELI, o grau histopatológico de malignidade foi analisado no *front* de invasão tumoral, com base no sistema proposto por Bryne *et al.*<sup>32</sup> Os escores atribuídos aos parâmetros que compõem esse sistema (grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório), foram somados para se obter o escore final de malignidade do caso. Dessa forma, tumores com escore final menor ou igual a 8 foram classificados como de baixo grau de malignidade e lesões com escore final maior ou igual a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade.<sup>33</sup>

#### *Imunoistoquímica*

Cortes teciduais com 3µm de espessura foram obtidos, a partir do material biológico emblocado em parafina, e estendidos em lâminas de vidro silanizadas. Em seguida, os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Tabela 1). Posteriormente, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3%, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, e incubados com os anticorpos primários policlonais anti-RGα e anti-LC3A e anticorpos monoclonais anti-Atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR (Tabela 1). Em sequência, os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 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 Harris, desidratados e montados com lamínula. O controle interno positivo para o anticorpo anti-RGα foi realizado com células endoteliais presentes nos cortes histológicos de QA e CCELI. Para os demais anticorpos, cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória foram utilizados como controle positivo. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

#### *Análise imunoistoquímica*

Os cortes teciduais foram analisados por uma examinadora previamente treinada, sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sem que a mesma tivesse conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. Para todos os anticorpos, foram consideradas apenas as imunoexpressões nas células epiteliais das lesões. Para todas as proteínas estudadas, as análises foram realizadas separadamente para as expressões citoplasmática e nuclear. Nas QAs, as imunoexpressões de RGα, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram avaliadas em toda a extensão do revestimento epitelial. Por sua vez, nos CCELI, as expressões dessas proteínas foram avaliadas no *front* de invasão tumoral.

Adaptando-se a metodologia do estudo de Moreno-Galindo *et al.*,<sup>34</sup> foi realizada uma análise quantitativa da imunoexpressão das proteínas RGα, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR. Sob aumento de 100×, foram selecionados 5 campos de maior imunorreatividade nas QAs e 10 campos de maior imunorreatividade nos CCELI. Cada um desses campos foi fotomicrografado (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH), sob aumento de 400×, e as imagens obtidas foram transferidas para o programa ImageJ® (*Imaging Processing and*

*Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das células imunomarcadas e das células negativas. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados e, por fim, estabeleceu-se o percentual de células imunopositivas para cada caso.

### **Análise estatística**

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com as análises imunoistoquímicas foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, comparações entre as medianas dos percentuais de células imunopositivas para RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR, de acordo com o tipo de lesão e os diversos parâmetros clinicopatológicos, foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Por sua vez, correlações entre as imunoexpressões de RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman.

Devido ao pequeno número de casos exibindo imunorreatividade em núcleo, com baixos percentuais de positividade, os dados referentes à expressão das proteínas Atg7 e p-mTOR foram submetidos apenas à análise descritiva. Pelas mesmas razões, os dados provenientes da expressão nuclear de LC3A nos CCELI também foram analisados apenas por meio de estatística descritiva. Para todos os testes estatísticos, considerou-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados**

#### *Análises clínicas e morfológicas*

Os resultados das análises clínicas e morfológicas se encontram sumarizados na Tabela 2. No grupo das QA, a maioria dos casos (85,0%) foram diagnosticados em indivíduos do sexo masculino, com uma proporção homem/ mulher de 5,7:1. A idade dos pacientes variou de 26 a 97 anos, com uma média de  $69,4 \pm 15,7$  anos. Em relação à displasia epitelial, constatou-se uma distribuição relativamente similar entre casos de baixo grau (52,5%) e de alto grau (47,5%).

Nos CCELI, a maioria dos casos (72,5%) foram provenientes de indivíduos do sexo masculino, com uma proporção homem/ mulher de 2,6:1. A idade dos pacientes variou de 25 a 82 anos, com uma média de  $57,4 \pm 13,3$  anos. Em relação ao tamanho do tumor e à metástase

nodal regional, constatou-se maior frequência de casos classificados como T2 (62,5%) e N0 (57,5%). A maioria dos casos demonstrou ausência de metástase à distância (92,5%) e, por sua vez, a análise do estadiamento clínico revelou maior frequência de lesões em estágio II (40,0%). Em relação ao grau histopatológico de malignidade, observou-se uma maior frequência de casos com alto grau (65,0%).

### *Análises imunoistoquímicas*

#### *Imunoexpressão de RGα*

Foi constatada expressão citoplasmática de RGα em todos os casos de QA e CCELI (Figura 1A,B), com maiores percentuais de positividade nos últimos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 3) (Figura 2A). Considerando os parâmetros clinicopatológicos das lesões, foram identificadas diferenças estatisticamente significativas apenas em relação ao grau histopatológico de malignidade dos CCELI (Figuras 3A, 4A e 5A–C). Lesões com alto grau de malignidade apresentaram maiores percentuais de positividade citoplasmática para RGα quando comparadas às lesões com baixo grau de malignidade ( $p = 0,016$ ) (Figura 4A).

Expressão nuclear de RGα foi observada em todos os casos de QA e CCELI (Figura 1A,B), com menores percentuais de positividade nos últimos ( $p = 0,021$ ) (Tabela 3) (Figura 2B). Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão nuclear de RGα de acordo com o grau de displasia epitelial nas QAs ( $p > 0,05$ ) (Figura 3B). De forma similar, não foram constatadas diferenças significativas na imunoexpressão nuclear de RGα em relação aos parâmetros clinicopatológicos dos CCELI ( $p > 0,05$ ) (Figuras 4B e 6A–C).

#### *Imunoexpressão de Atg7*

Expressão citoplasmática de Atg7 foi constatada em todos os casos de QA e na maioria dos CCELI (92,5%) avaliados (Figura 7A,B), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação aos percentuais de imunopositividade ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3) (Figura 2A). Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão citoplasmática de Atg7 foi observada em relação aos diversos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCELI ( $p > 0,05$ ) (Figuras 3A, 4A e 5A–C).

Foi identificada imunoexpressão nuclear de Atg7 em apenas 8 (20,0%) casos de QA e 9 (22,5%) casos de CCELI, com baixos percentuais de positividade (Tabela 3) (Figuras 2B, 3B, 4B, 6A–C).

### *Imunoexpressão de LC3A*

Foi observada expressão citoplasmática de LC3A em todos os casos de QA e em 15 (37,5%) casos de CCELI (Figura 7C,D), com percentuais de imunopositividade significativamente inferiores nos últimos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 3) (Figura 2A). Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na expressão citoplasmática dessa proteína em relação aos diversos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCELI ( $p > 0,05$ ) (Figuras 3A, 4A e 5A–C).

Imunoexpressão nuclear de LC3A foi observada em 29 (72,5%) casos de QA, com baixos percentuais de positividade (Tabela 3) (Figura 2B). Nesse grupo de lesões, os casos com baixo grau de displasia epitelial apresentaram maiores percentuais de imunopositividade para LC3A quando comparados aos casos com alto grau de displasia epitelial ( $p = 0,004$ ) (Figura 3B). Em relação aos CCELI, nenhum dos casos analisados apresentou imunorreatividade nuclear para LC3A.

### *Imunoexpressão de p62*

Expressão citoplasmática de p62 foi observada na maioria dos casos de QA (95,0%) e CCELI (82,5%) avaliados no presente estudo (Figura 8A,B), com percentuais de imunopositividade significativamente inferiores nos últimos ( $p = 0,003$ ) (Tabela 3) (Figura 2A). Em relação aos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCELI, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão citoplasmática de p62 ( $p > 0,05$ ) (Figuras 3A, 4A e 5A–C).

Foi identificada imunorreatividade nuclear para p62 na maioria das QAs (90,0%) e dos CCELI (92,5%) analisados nesta pesquisa (Figura 8A,B), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação aos percentuais de positividade ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3) (Figura 2B). Nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão nuclear dessa proteína foi observada em relação aos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCELI ( $p > 0,05$ ) (Figuras 3B, 4B e 6A–C).

### *Imunoexpressão de p-mTOR*

Imunorreatividade citoplasmática para p-mTOR na maioria dos casos de QA (80,0%) e em uma menor proporção dos CCELI (35,0%), com percentuais de positividade significativamente inferiores nos últimos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 3) (Figura 2A). Nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão citoplasmática de p-mTOR foi observada

em relação aos diversos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCELIIs ( $p > 0,05$ ) (Figuras 3A, 4A e 5A–C).

Expressão nuclear de p-mTOR foi observada em 16 (40,0%) casos de QA e apenas 2 (5,0%) casos de CCELI, com baixos percentuais de imunopositividade (Tabela 3) (Figuras 2B, 3B, 4B, 6A–C).

#### *Correlação entre as imunoexpressões de $RG\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR*

Nas QAs, foram identificadas correlações positivas entre as imunoexpressões citoplasmática e nuclear de  $RG\alpha$  ( $r = 0,314$ ;  $p = 0,048$ ), p62 ( $r = 0,699$ ;  $p < 0,001$ ), LC3A ( $r = 0,443$ ;  $p = 0,004$ ) e p-mTOR ( $r = 0,396$ ;  $p = 0,011$ ). Nessas lesões, outras correlações positivas, estatisticamente significativas, foram observadas entre as imunoexpressões das proteínas relacionadas à autofagia e se encontram sumarizadas na Tabela Suplementar 1. Não foram identificadas correlações estatisticamente significativas entre as imunoexpressões de  $RG\alpha$  e das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) ( $p > 0,05$ ).

Nos CCELIIs, foram constatadas correlações positivas entre as imunoexpressões citoplasmática e nuclear de  $RG\alpha$  ( $r = 0,416$ ;  $p = 0,008$ ), Atg7 ( $r = 0,488$ ;  $p = 0,001$ ), p62 ( $r = 0,728$ ;  $p < 0,001$ ) e p-mTOR ( $r = 0,375$ ;  $p = 0,017$ ). Nessas lesões, também foram observadas correlações positivas entre as imunoexpressões das proteínas relacionadas à autofagia, as quais se apresentam sumarizadas na Tabela Suplementar 2. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as imunoexpressões de  $RG\alpha$  e das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) ( $p > 0,05$ ).

## **Discussão**

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da QA e sua progressão para um CCE têm sido objeto de intensa investigação científica. Nesse contexto, resultados de um estudo recente, conduzido por nosso grupo de pesquisa, revelaram uma potencial participação da  $RG\alpha$  na carcinogênese labial, provavelmente desempenhando funções que não envolvem a modulação das expressões das proteínas BCL-2 e BAX.<sup>8</sup> Embora a regulação da apoptose seja uma das principais funções relacionadas aos glicocorticoides e seus receptores, pesquisas têm ressaltado um potencial envolvimento destas proteínas no processo de autofagia.<sup>35</sup> Neste sentido, evidências sugerem que a interação dos glicocorticoides e seus receptores é capaz de determinar o aumento da transcrição de diversos genes relacionados à autofagia, como *ATG5*, *LC3*, *BECN1* e *SQSTM1*.<sup>13</sup>

Na presente pesquisa, resultados semelhantes aos observados por Sena *et al.*<sup>8</sup> foram identificados quanto a expressão de RG $\alpha$  nas QAs e CCELI. Considerando as imunoexpressões citoplasmática e nuclear de RG $\alpha$  e sua relação com os parâmetros clinicopatológicos, foram identificadas diferenças significativas apenas para a imunoexpressão citoplasmática em relação ao grau histopatológico de malignidade nos CCELI. Ao avaliar a correlação entre RG $\alpha$  e proteínas de autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR), não foram observadas diferenças significativas. Esses resultados confirmam o envolvimento da RG $\alpha$  na patogênese das QAs e CCELI, os quais podem não envolver a modulação das proteínas relacionadas a autofagia.

A autofagia consiste em um sistema de degradação intracelular, coordenado por genes da família *ATG*.<sup>15,16</sup> As proteínas codificadas a partir desses genes são necessárias durante as diversas etapas da autofagia.<sup>14,15</sup> A autofagia promove a sobrevivência celular durante períodos de estresse metabólico induzido pela privação de nutrientes.<sup>36</sup> Assim, é possível que as células tumorais induzam a autofagia para sobreviver ao estresse no microambiente tumoral.<sup>14,37</sup> Por outro lado, a autofagia pode funcionar como um mecanismo de morte celular, especialmente em células com defeitos na apoptose.<sup>15,18</sup>

No presente estudo, foi constatada imunoexpressão citoplasmática das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nos casos de QA e CCELI. Quanto a imunoexpressão das proteínas de autofagia e sua relação aos parâmetros clínicos nos CCELI, não foram identificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Entretanto, no estudo desenvolvido por Liu *et al.*,<sup>27</sup> utilizando os marcadores de autofagia LC3B e p62 em casos de CCEs localizados em língua, mucosa jugal e lábio, foi identificado maiores níveis de expressão citoplasmática de LC3B e p62 nos CCEs em comparação aos tecidos normais adjacentes. Além disso, foram identificadas menores sobrevidas de doença específica em pacientes com CCEs de mucosa jugal e CCEs de lábio que apresentavam alta coexpressão de LC3B e p62 ( $p < 0,05$ ). De acordo com os autores, esses resultados sugerem que LC3B e p62 podem modular a autofagia para promover a tumorigênese e a quimiorresistência no CCE oral. Outros resultados, em CCEs orais avaliaram a imunoexpressão da proteína LC3, identificando que a alta expressão desta proteína foi estatisticamente associada a menores taxas de sobrevida e pior prognóstico ( $p < 0,01$ ) sugerindo que a expressão de LC3 pode ser um indicador de prognóstico desfavorável.<sup>38</sup>

Foram constatados altos níveis de expressão citoplasmática de Atg7 nas QAs e CCELI, proteína que participa da ativação da LC3, uma importante proteína envolvida na

formação dos autofagossomos,<sup>17,18</sup> porém sem diferenças significativas quanto aos parâmetros clínicos e morfológicos nas lesões analisadas. Além disso, foram identificados baixos percentuais de imunopositividade citoplasmática de p62, importante proteína responsável por sinalizar as moléculas citoplasmáticas a serem degradadas<sup>39</sup> e baixos níveis de expressão de p-mTOR, molécula sinalizadora de inibição do processo autofágico,<sup>15,16</sup> em ambos os grupos, possivelmente ocorrendo de forma mais intensa nos CCELI, em razão dos menores níveis de imunopositividade nas QAs, sugerindo um microambiente favorável a esse processo. No estudo desenvolvido por Liu *et al.*,<sup>27</sup> não foram observadas diferenças significativas na expressão de p62 e LC3B em relação aos parâmetros clínicos nos CCEs de lábio. Entretanto foram identificadas menores sobrevidas de doença específica em pacientes com CCEs de lábio que apresentavam alta coexpressão de p62 e LC3B. Dessa forma, os autores sugerem que a depender da localização anatômica, a p62 e LC3B podem modular a autofagia promovendo o desenvolvimento do câncer.

Foram identificadas imunoexpressões citoplasmática para LC3A nos casos de QA e CCELI, com menores níveis de expressão nestes últimos. Entretanto, não foram identificadas diferenças significativas quanto aos parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástases linfonodais regionais e estágio clínico) dos CCELI ( $p > 0,05$ ). Nesse contexto, sugere-se a necessidade de investigar outras isoformas de LC3, que, possivelmente podem estar relacionadas a mudanças nas composições dos vacúolos autofágicos nessas lesões.<sup>21</sup>

As proteínas de autofagia são expressas predominantemente no citoplasma das células, entretanto, as expressões nucleares dessas proteínas podem desempenhar funções não relacionadas a autofagia.<sup>40</sup> Dessa forma, os resultados deste estudo, sugerem que a nucleofagia pode não estar relacionada a patogênese dessas lesões. No contexto da expressão nuclear de LC3A, nas QAs, baixos níveis de imunopositividade foram observados. Entretanto, foram identificadas maiores expressões nas QAs de baixo grau quando comparadas as lesões de alto grau ( $p < 0,01$ ). Em relação aos CCELI, não houve imunorreatividade nuclear de LC3A nos casos analisados. Com base nesses resultados, sugere-se que a expressão de LC3A no núcleo pode estar relacionada a outras funções mediadas por essa proteína, podendo estar envolvida nos processos de transdução de sinais. Dessa forma, novas pesquisas se fazem necessárias para avaliar o papel dessa proteína na carcinogênese labial.<sup>21</sup>

Expressões nucleares de p62 foram identificadas nos casos de QA e CCELI. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre a imunoexpressão de p62 em relação aos parâmetros clínicos e morfológicos ( $p > 0,05$ ). Além de seu papel crucial como fator de ligação com proteínas ubiquitinadas e organelas, a p62 funciona como um centro de

sinalização em várias vias de transdução, como a sinalização do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), a ativação da apoptose e a resposta ao estresse ambiental. Dessa forma, a autofagia prejudicada pelos níveis de expressão anormal de p62 pode ser acompanhada por ativação persistente dessas vias de sinalização, contribuindo na tumorigênese.<sup>41</sup>

Apesar dos importantes achados da presente pesquisa, algumas limitações devem ser consideradas. Nesse contexto, ressalta-se a ausência de informações referentes à sobrevida dos pacientes e à confirmação histopatológica das metástases linfonodais regionais e à distância. Esses dados seriam importantes para avaliar um eventual impacto da expressão de RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR no prognóstico dos pacientes. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de futuras investigações para estabelecer em definitivo o papel dessas proteínas na carcinogênese labial, bem como sua eventual influência na progressão dos CCELI.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que a translocação nuclear reduzida da RG $\alpha$  e a regulação positiva da autofagia constituam eventos importantes na carcinogênese labial, mas provavelmente não estão envolvidos na progressão dos CCELI. Nesse processo, o papel da RG $\alpha$  pode não estar primariamente relacionado à modulação das expressões das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR.

## Referências

1. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125:582-590. doi: 10.1016/j.oooo.2018.03.011.
2. Varela-Centelles P, Seoane-Romero J, García-Pola MJ, Leira-Feijoo Y, Seoane-Romero JM. Therapeutic approaches for actinic cheilitis: therapeutic efficacy and malignant transformation after treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2020;49:1343-1350. doi: 10.1016/j.ijom.2020.02.014.
3. Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:498-503. doi: 10.1016/j.joms.2006.09.016.
4. dos Santos JN, de Sousa SO, Nunes FD, Sotto MN, de Araújo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol.* 2003;30:237-41. doi: 10.1046/j.0303-6987.2002.028.x.
5. Lai M, Pampena R, Cornacchia L, Pellacani G, Peris K, Longo C. Treatments of actinic cheilitis: A systematic review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83:876-887. doi: 10.1016/j.jaad.2019.07.106.

6. Kerawala C, Roques T, Jeannon JP, Bisase B. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016;130:S83-S89. doi: 10.1017/S0022215116000499.
7. Agostini T, Spinelli G, Arcuri F, Perello R. Metastatic squamous cell carcinoma of the lower lip: Analysis of the 5-year survival rate. *Arch Craniofac Surg.* 2017;18:105-111. doi: 10.7181/acfs.2017.18.2.105.
8. Sena LSB, da Silveira ÉJD, Batista AC, Mendonça EF, Alves PM, Nonaka CFW. Immunoexpression of glucocorticoid receptor alpha (GR $\alpha$ ) isoform and apoptotic proteins (Bcl-2 and Bax) in actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018;47:788-795. doi: 10.1111/jop.12757.
9. Veneris JT, Darcy KM, Mhaweche-Fauceglia P, et al. High glucocorticoid receptor expression predicts short progression free survival in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2017;146:153-160.
10. Iwata T, Sadahira T, Ochiai K, et al. Tumor suppressor REIC/Dkk-3 and its interacting protein SGTA inhibit glucocorticoid receptor to nuclear transport. *Exp Ther Med.* 2020;20:1739-1745. doi: 10.3892/etm.2020.8819.
11. Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell.* 2005;18:331-342. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.025.
12. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev.* 2013;24:41-56. doi: 10.1159/000342502.
13. Troncoso R, Paredes F, Parra V, et al. Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle.* 2014;13:2281-2295. doi:10.4161/cc.29272
14. Leone RD, Amaravadi RK. Autophagy: a targetable linchpin of cancer cell metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24:209-217. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.008.
15. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer.* 2020;19:12. doi: 10.1186/s12943-020-1138-4.
16. Gross AS, Graef M. Mechanisms of autophagy in metabolic stress response. *J Mol Biol.* 2020;432:28-52. doi: 10.1016/j.jmb.2019.09.005.
17. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015;34:856-880. doi: 10.15252/embj.201490784.

18. Kocaturk NM, Akkoc Y, Kig C, Bayraktar O, Gozuacik D, Kutlu O. Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci.* 2019;134:116-137. doi: 10.1016/j.ejps.2019.04.011.
19. Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* 2016;30:3961-3978. doi: 10.1096/fj.201600698R.
20. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12:1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
21. Subramani S, Malhotra V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep.* 2013;14:143-151. doi: 10.1038/embor.2012.220.
22. Saiyin W, Wang D, Li L, et al. Sequential release of autophagy inhibitor and chemotherapeutic drug with polymeric delivery system for oral squamous cell carcinoma therapy. *Mol Pharm.* 2014;11:1662-1675. doi: 10.1021/mp5000423.
23. Duran A, Amanchy R, Linares JF, et al. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell.* 2011;44:134-146. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.038
24. Appuhamy JA, Nayananjalie WA, England EM, Gerrard DE, Akers RM, Hanigan MD. Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells. *J Dairy Sci.* 2014;97:419-429. doi: 10.3168/jds.2013-7189.
25. Yun CW, Lee SH. The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19:3466. doi: 10.3390/ijms19113466.
26. de Lima TB, Paz AHR, Rados PV, et al. Autophagy analysis in oral carcinogenesis. *Pathol Res Pract.* 2017;213:1072-1077. doi: 10.1016/j.prp.2017.07.027.
27. Liu PF, Chang HW, Cheng JS, et al. Map11c3b and Sqstm1 modulated autophagy for tumorigenesis and prognosis in certain subsites of oral squamous cell carcinoma. *J Clin Med.* 2018;7:478. doi: 10.3390/jcm7120478.
28. Sobin LH, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumors.* New Jersey: John Wiley & Sons, 2002; 264.
29. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors.* Lyon: IARC Press, 2005; 177-179.
30. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:127-133. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x.

31. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006;42:987-993. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.12.014.
32. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.* 1992;166:375-381. doi: 10.1002/path.1711660409.
33. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol.* 2007;15:376-383. doi: 10.1177/1066896907304992.
34. Moreno-Galindo C, Hermsen M, García-Pedrero JM, Fresno MF, Suárez C, Rodrigo JP. p27 and BCL2 expression predicts response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2014;50:128-134. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.10.018.
35. Relic B, Charlier E, Deroyer C, et al. BAY 11-7085 induces glucocorticoid receptor activation and autophagy that collaborate with apoptosis to induce human synovial fibroblast cell death. *Oncotarget.* 2016;7:23370-23382. doi:10.18632/oncotarget.8042.
36. Kimmelman AC, White E. Autophagy and tumor metabolism. *Cell Metab.* 2017;25:1037-1043. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.004.
37. Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *FEBS J.* 2018;285:1751-1766. doi: 10.1111/febs.14388.
38. Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Chu PY, Chai CY. High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2013;44:2558-2562. doi: 10.1016/j.humpath.2013.06.017
39. Racoma IO, Meisen WH, Wang QE, Kaur B, Wani AA. Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells. *PLoS One.* 2013;8:e72882. doi: 10.1371/journal.pone.0072882.
40. Luo M, Zhao X, Song Y, Cheng H, Zhou R. Nuclear autophagy: an evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. *Autophagy.* 2016;12:1973-1983. doi: 10.1080/15548627.2016.1217381.
41. Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res.* 2012;66:457-462. doi: 10.1016/j.phrs.2012.07.004.

## Tabelas

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

<b>Especificidade</b>	<b>Clone/ referência</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Incubação</b>
RG $\alpha$ *	P20	Santa Cruz Biotechnology	1:200	<i>Trilogy</i> , pH 6,0 <i>Pascal</i> , 121°C, 3 min	60 minutos
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	1:600	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:300	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	<i>Overnight</i>

\*Para este anticorpo, a desparafinização, a reidratação e a recuperação antigênica foram realizadas em etapa única, com uso da solução *Trilogy* (Cell Marque<sup>TM</sup>, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

**Tabela 2** Distribuição absoluta e relativa dos casos de QA e CCELI de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.

<b>Parâmetros clinicopatológicos</b>	<b>n (%)</b>
<b>Queilite actínica</b>	
<i>Sexo</i>	
Masculino	34 (85,0)
Feminino	6 (15,0)
<i>Grau de displasia epitelial</i>	
Baixo grau	21 (52,5)
Alto grau	19 (47,5)
<b>Carcinoma de células escamosas</b>	
<i>Sexo</i>	
Masculino	29 (72,5)
Feminino	11 (27,5)
<i>Tamanho do tumor</i>	
T1	12 (30,0)
T2	25 (62,5)
T3	2 (5,0)
T4	1 (2,5)
<i>Metástase nodal regional</i>	
N0	23 (57,5)
N1	13 (32,5)
N2	3 (7,5)
N3	1 (2,5)
<i>Metástase à distância</i>	
M0	37 (92,5)
M1	3 (7,5)
<i>Estágio clínico</i>	
Estágio I	7 (17,5)
Estágio II	16 (40,0)
Estágio III	11 (27,5)
Estágio IV	6 (15,0)
<i>Grau histopatológico de malignidade</i>	
Baixo grau	14 (35,0)
Alto grau	26 (65,0)

**Tabela 3.** Tamanho da amostra, número de casos positivos, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas (núcleo e citoplasma) para RGA, Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação aos grupos de lesões.

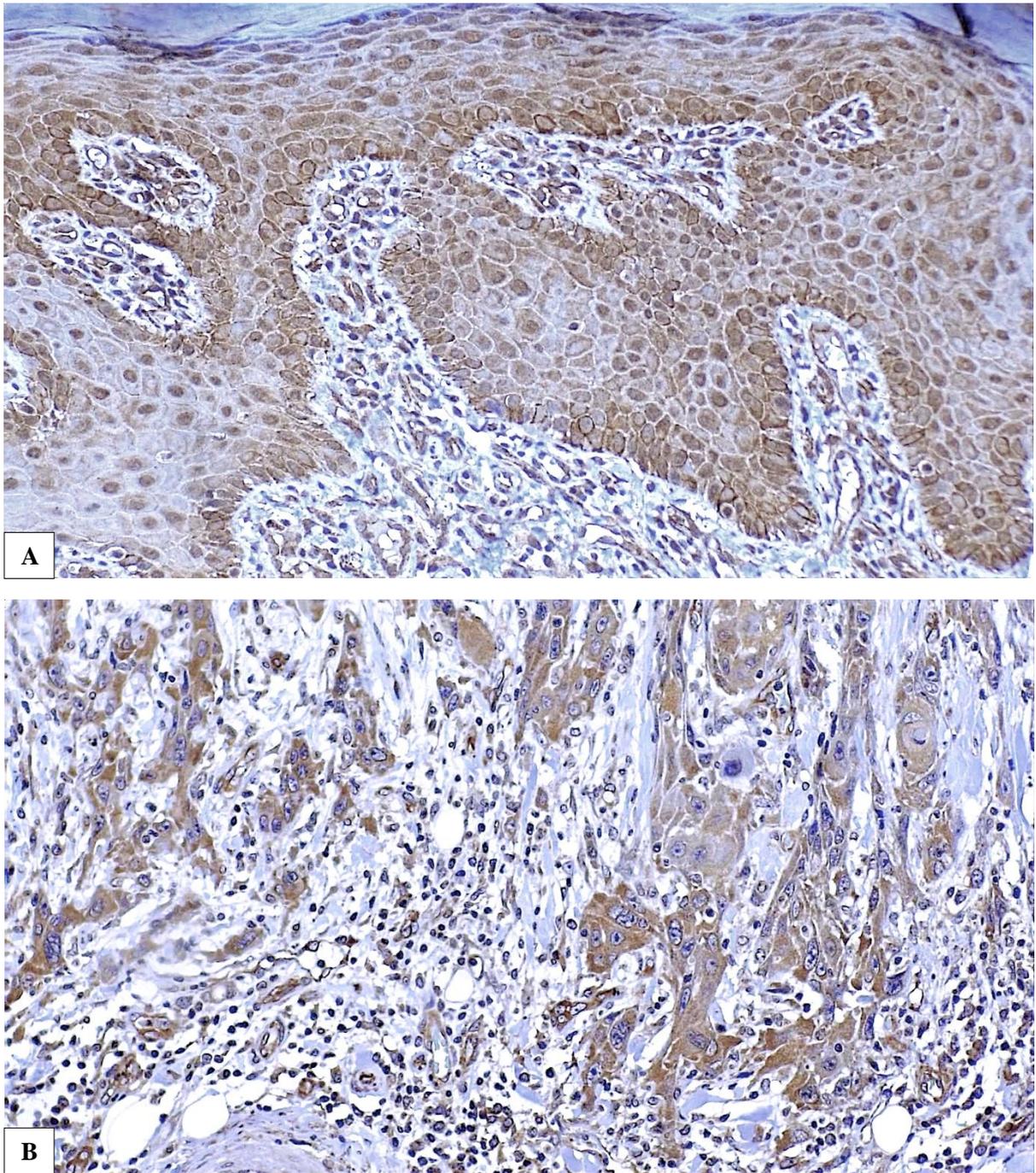
Proteínas/ grupos	n	Citoplasma		Núcleo	
		Casos positivos (%)	Mediana (variação)	Casos positivos (%)	Mediana (variação)
<b><i>RGa</i></b>					
QA	40	40 (100,0)	97,3 (48,6 – 100,0)	40 (100,0)	86,9 (1,3 – 99,9)
CCE	40	40 (100,0)	100,0 (1,01 – 100,0)	40 (100,0)	71,0 (5,3 – 98,6)
<b><i>Atg7</i></b>					
QA	40	40 (100,0)	78,9 (1,5 – 100,0)	8 (20,0)	0,0 (0,0 – 1,1)
CCE	40	37 (92,5)	91,6 (0,0 – 100,0)	9 (22,5)	0,0 (0,0 – 31,5)
<b><i>LC3A</i></b>					
QA	40	40 (100,0)	40,4 (0,9 – 83,3)	29 (72,5)	2,3 (0,0 – 39,1)
CCE	40	15 (37,5)	0,0 (0,0 – 99,2)	0 (0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)
<b><i>p62</i></b>					
QA	40	38 (95,0)	40,0 (0,0 – 90,9)	36 (90,0)	6,7 (0,0 – 57,1)
CCE	40	33 (82,5)	1,8 (0,0 – 98,3)	37 (92,5)	4,7 (0,0 – 84,3)
<b><i>p-mTOR</i></b>					
QA	40	32 (80,0)	11,1 (0,0 – 63,6)	16 (40,0)	0,0 (0,0 – 41,8)
CCE	40	14 (35,0)	0,0 (0,0 – 16,3)	2 (5,0)	0,0 (0,0 – 0,9)

**Tabela Suplementar 1** Coeficientes de correlação de Spearman ( $r$ ) e respectivas significâncias estatísticas ( $p$ ) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nas QAs.

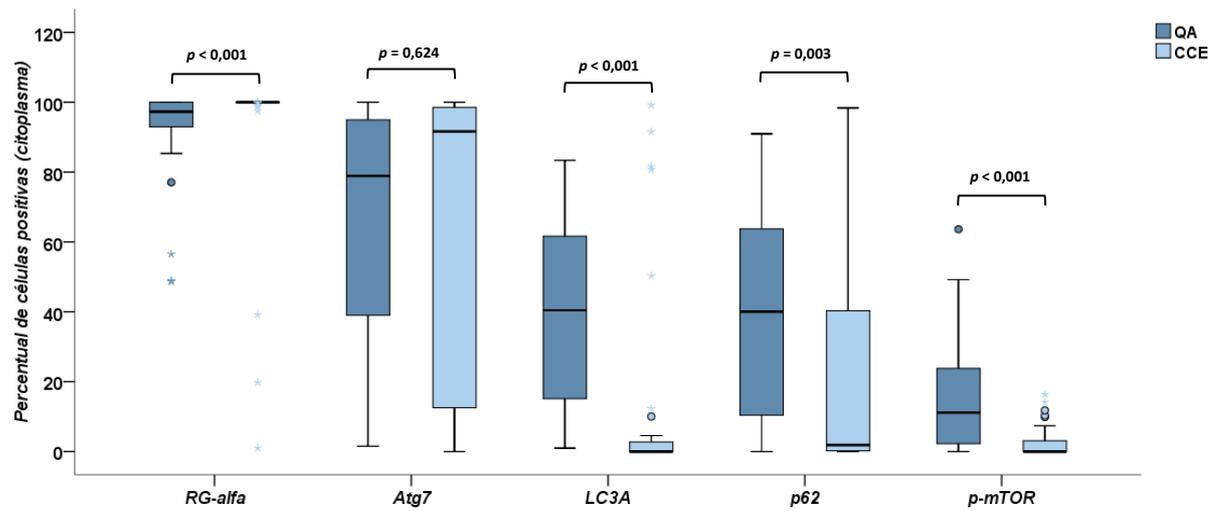
	<b>Atg7</b> (citoplasma)	<b>LC3A</b> (citoplasma)	<b>p62</b> (citoplasma)	<b>p-mTOR</b> (citoplasma)	<b>LC3A</b> (núcleo)	<b>p62</b> (núcleo)
<b>Atg7</b> (citoplasma)	1					
<b>LC3A</b> (citoplasma)	$r = 0,505$ $p = \mathbf{0,001}$	1				
<b>p62</b> (citoplasma)	$r = 0,384$ $p = \mathbf{0,014}$	$r = 0,338$ $p = \mathbf{0,033}$	1			
<b>p-mTOR</b> (citoplasma)	$r = 0,320$ $p = \mathbf{0,044}$	$r = 0,522$ $p = \mathbf{0,001}$	$r = 0,198$ $p = 0,220$	1		
<b>LC3A</b> (núcleo)	$r = 0,362$ $p = \mathbf{0,022}$	$r = 0,443$ $p = \mathbf{0,004}$	$r = 0,295$ $p = 0,065$	$r = 0,400$ $p = \mathbf{0,011}$	1	
<b>p62</b> (núcleo)	$r = 0,264$ $p = 0,099$	$r = 0,435$ $p = \mathbf{0,005}$	$r = 0,699$ $p < \mathbf{0,001}$	$r = 0,256$ $p = 0,110$	$r = 0,284$ $p = 0,076$	1

**Tabela Suplementar 2** Coeficientes de correlação de Spearman ( $r$ ) e respectivas significâncias estatísticas ( $p$ ) em relação aos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR nos CCELIIs.

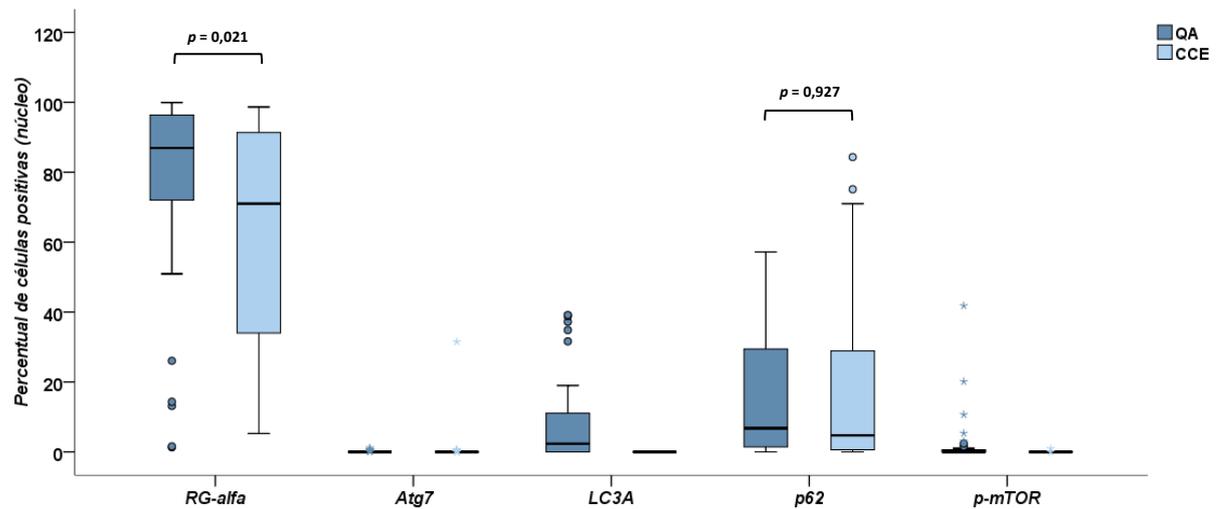
	<b>Atg7</b> (citoplasma)	<b>LC3A</b> (citoplasma)	<b>p62</b> (citoplasma)	<b>p-mTOR</b> (citoplasma)	<b>p62</b> (núcleo)
<b>Atg7</b> (citoplasma)	1				
<b>LC3A</b> (citoplasma)	$r = 0,050$ $p = 0,760$	1			
<b>p62</b> (citoplasma)	$r = 0,357$ $p = \mathbf{0,024}$	$r = 0,451$ $p = \mathbf{0,003}$	1		
<b>p-mTOR</b> (citoplasma)	$r = 0,166$ $p = 0,307$	$r = 0,560$ $p < \mathbf{0,001}$	$r = 0,449$ $p = \mathbf{0,004}$	1	
<b>p62</b> (núcleo)	$r = 0,252$ $p = 0,117$	$r = 0,519$ $p = \mathbf{0,001}$	$r = 0,728$ $p < \mathbf{0,001}$	$r = 0,620$ $p < \mathbf{0,001}$	1

**Figuras**

**Figura 1** Expressão citoplasmática e nuclear da RGA em QA (A) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×). Imunoexpressão predominantemente citoplasmática da RGA em CCELI (B) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×).

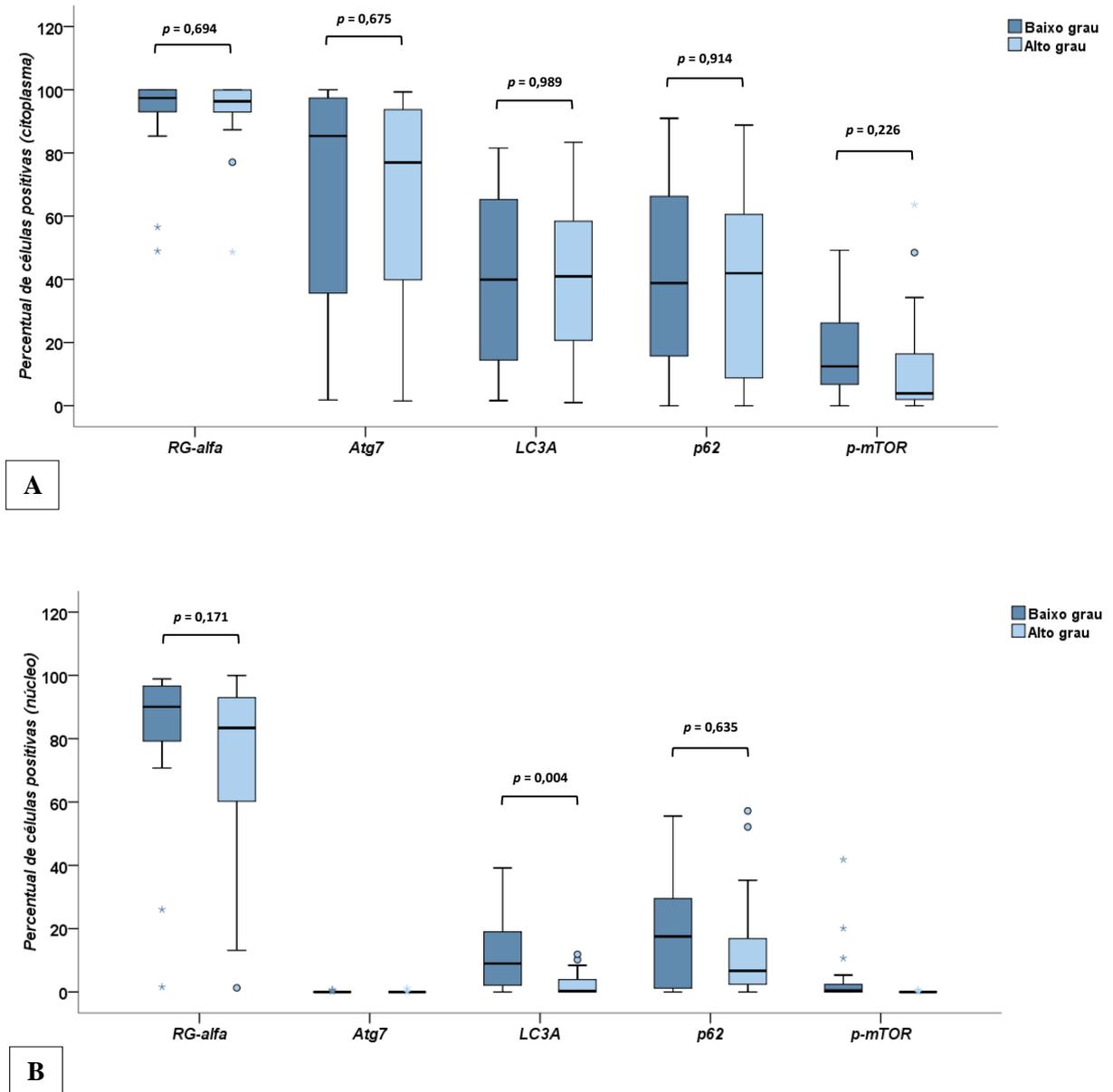


A

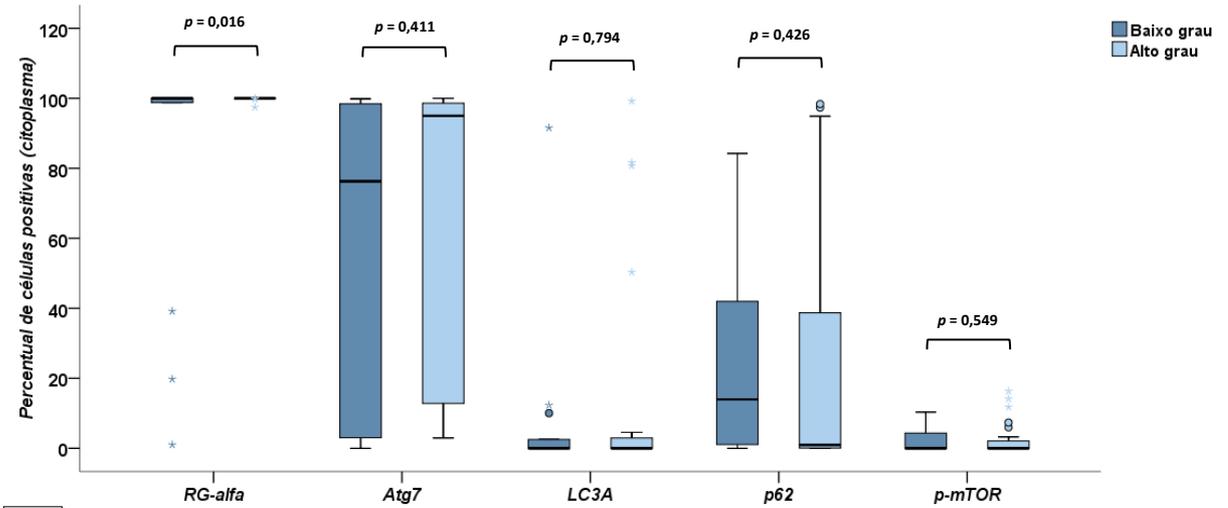


B

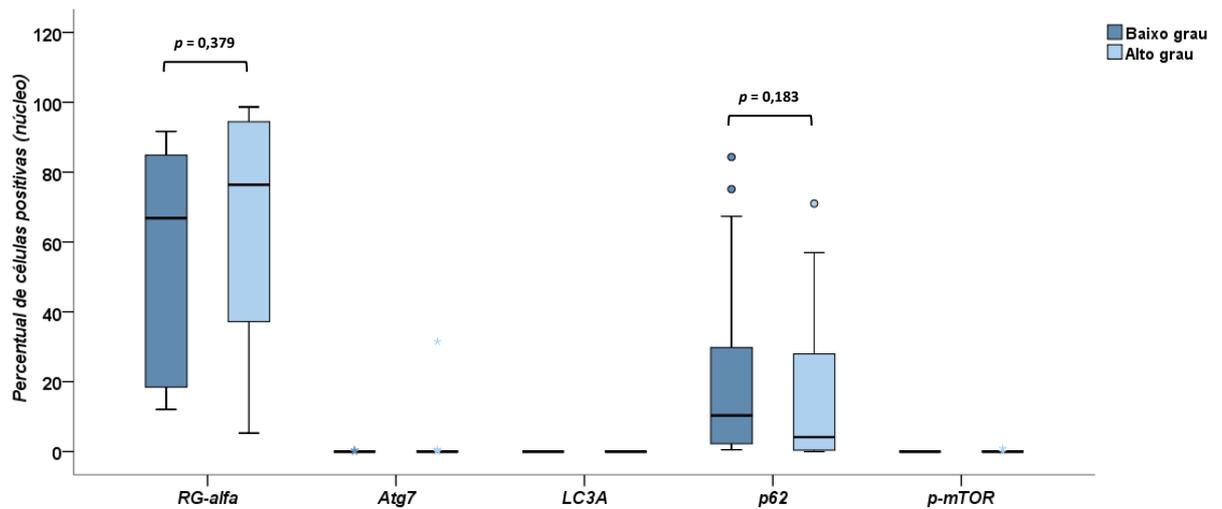
**Figura 2** Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de imunopositividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com os grupos de lesões.



**Figura 3** Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de imunopositividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com o grau de displasia epitelial nas QAs.

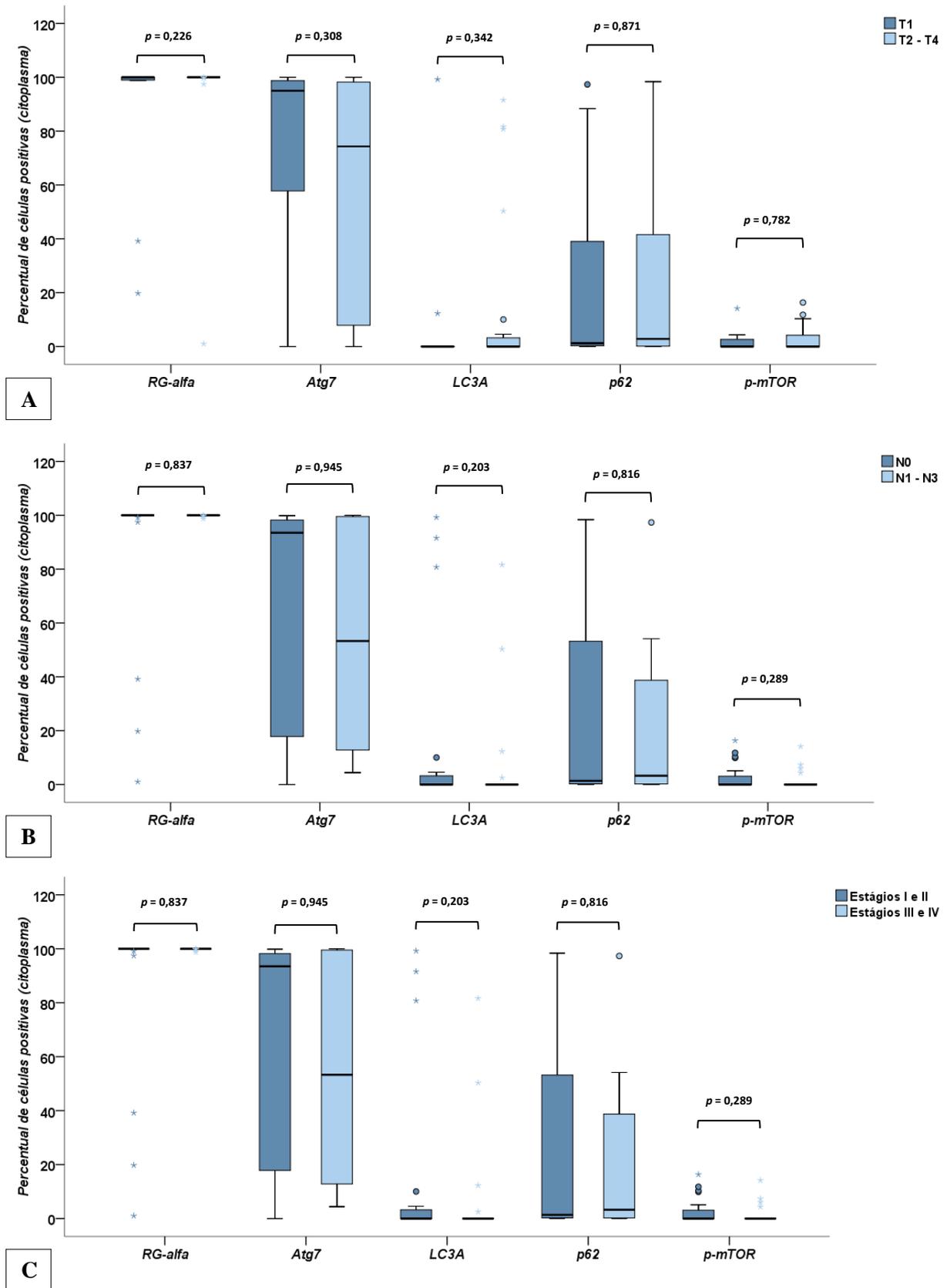


A

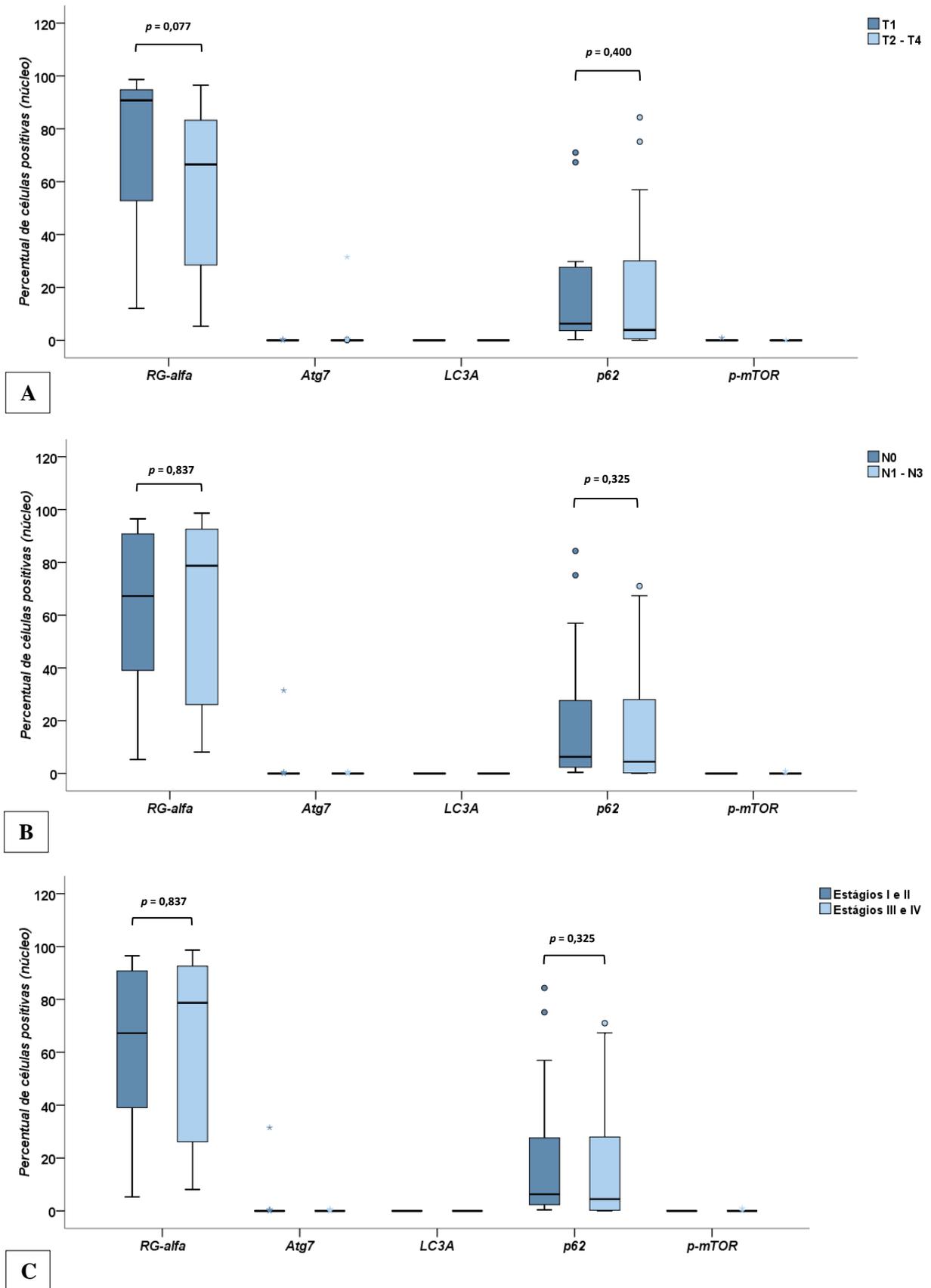


B

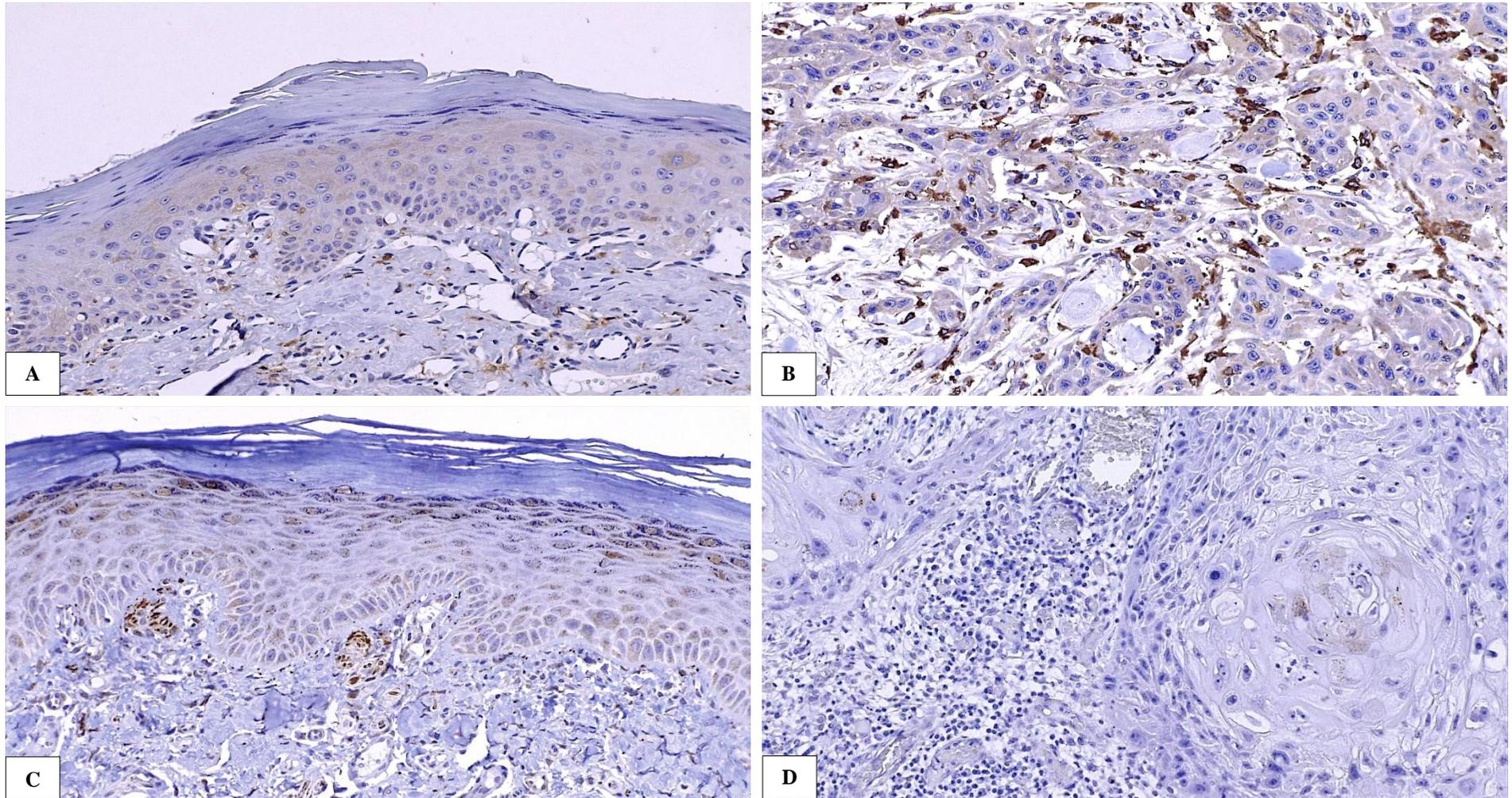
**Figura 4** Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de imunopositividade citoplasmática (A) e nuclear (B) para  $RG\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com o grau histopatológico de malignidade nos CCELI.



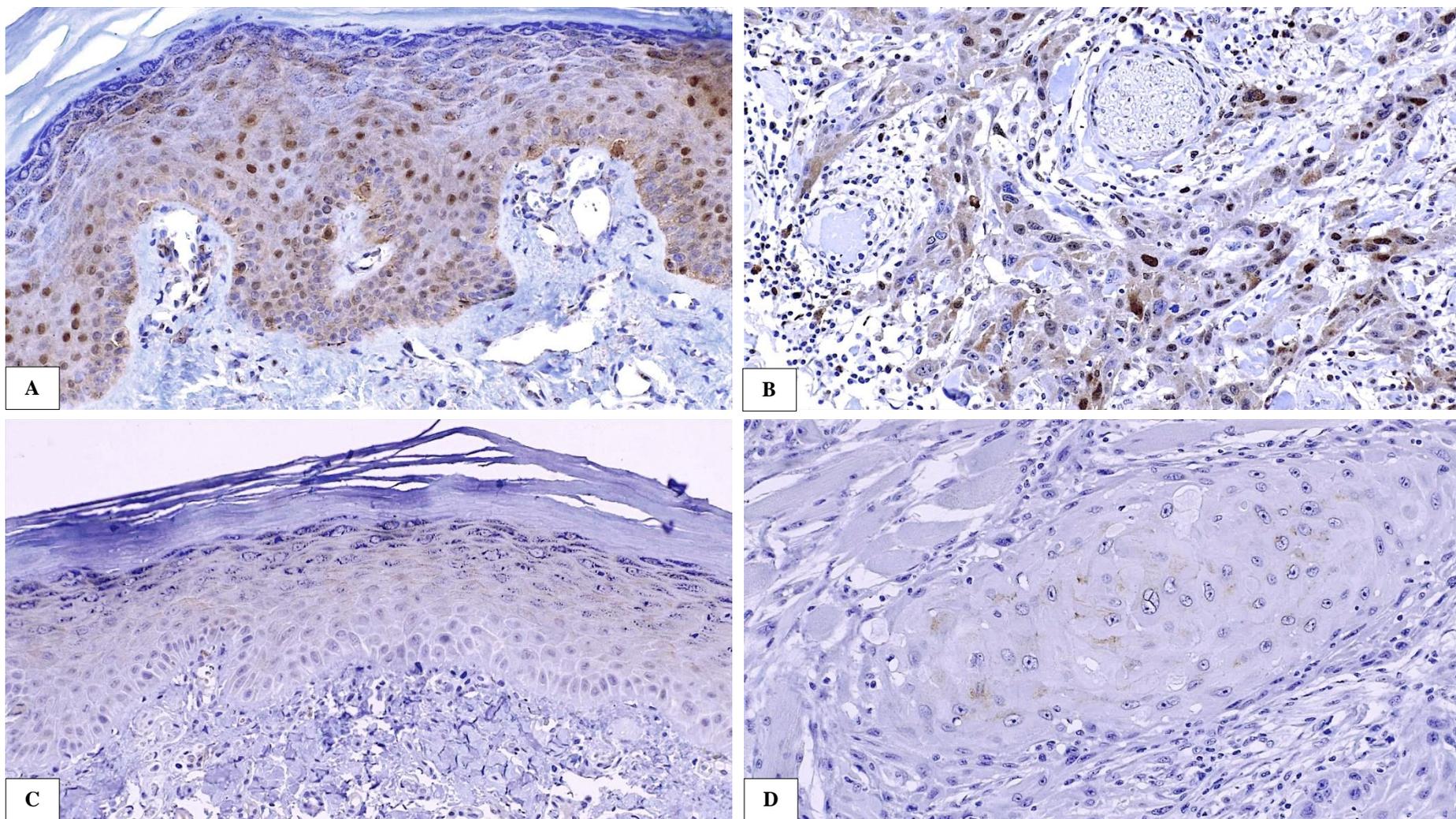
**Figura 5** Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade citoplasmática para  $RG\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao tamanho do tumor (A), metástase linfonodal regional (B) e estágio clínico (C) dos CCELI.



**Figura 6** Gráficos box-plot ilustrando o percentual de imunopositividade nuclear para RG $\alpha$ , Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em relação ao tamanho do tumor (A), metástase linfonodal regional (B) e estágio clínico (C) dos CCELI.



**Figura 7** Expressão citoplasmática de Atg7 em QA (A) e CCELI (B) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×). Expressão citoplasmática e nuclear de LC3A em QA (C) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×). Expressão citoplasmática de LC3A em CCELI (D) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×).



**Figura 8** Expressão citoplasmática e nuclear de p62 em QA (A) e CCELI (B) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×). Expressão citoplasmática de p-mTOR em QA (C) e CCELI (D) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×).

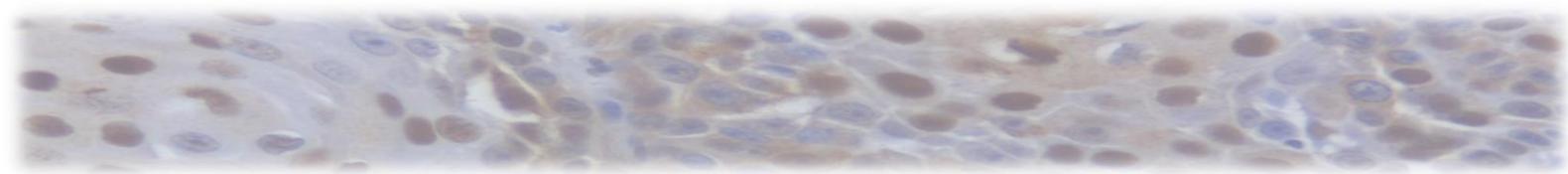
## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca pelo entendimento dos processos biológicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento da QA e na sua progressão para um CCE tem sido alvo de diversos estudos. Nesse cenário, o envolvimento do receptor de glicocorticoide na carcinogênese labial, especialmente a  $RG\alpha$ , tem se destacado nos últimos anos. Um estudo recentemente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa analisou as imunorexpressões da  $RG\alpha$ , BAX e BCL-2 em casos de QA e CCELI, sugerindo um papel importante da  $RG\alpha$  na carcinogênese labial, o qual parece não modular as expressões das proteínas relacionadas à apoptose.

Embora a modulação da apoptose represente uma das principais funções mediadas pelos glicocorticoides e seus receptores, pesquisas têm identificado um potencial envolvimento destas proteínas no processo de autofagia. Neste contexto, evidências sugerem que a interação dos glicocorticoides e seus receptores são capazes de determinar o aumento da transcrição de diversos genes relacionados à autofagia, como *ATG5*, *LC3*, *BECN1* e *SQSTM1*, ora relacionando a um mecanismo supressor tumoral, ora ao desenvolvimento e a progressão tumorais.

Os resultados do presente estudo sugerem que a translocação nuclear reduzida da  $RG\alpha$  e a regulação positiva da autofagia constituam eventos importantes na carcinogênese labial, o qual parecem não participar do processo de progressão tumoral nos CCELI. Além disso, o papel da  $RG\alpha$  nas lesões estudadas pode não estar primariamente relacionado à modulação das expressões das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR.

Uma compreensão abrangente dos diferentes papéis das proteínas relacionadas à autofagia na carcinogênese labial se faz necessária. Em especial, destaca-se a necessidade de investigações sobre a participação de outras proteínas e suas eventuais isoformas, a exemplo de LC3B e LC3C, bem como seu potencial envolvimento com fenômenos não relacionados à autofagia, como a transdução de sinal.



## REFERÊNCIAS

- ABDULJABBAR, R. *et al.* Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 150, n. 2, p. 335–46, 2015.
- AGOSTINI, T. *et al.* Metastatic squamous cell carcinoma of the lower lip: Analysis of the 5-year survival rate. **Arch. Craniofac. Surg.**, v. 18, n. 2, p. 105–11, 2017.
- AHN, S. *et al.* Transient receptor potential cation channel V1 (TRPV1) is degraded by starvation- and glucocorticoid-mediated autophagy. **Mol. Cells**, v. 37, p. 257–63, 2014.
- AKAR, U. *et al.* Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 669–79, 2008.
- ALMANGUSH, A. *et al.* A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 44, n. 2, p. 143–50, 2015.
- ALMANGUSH, A. *et al.* Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. **Oral Oncol.**, v. 107, p. 104799, 2020.
- ANNEROOTH, G.; BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, n. 9, p. 229–49, 1987.
- APPUHAMY, J. A. *et al.* Hanigan effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells. **J. Dairy Sci.**, v. 97, n. 1, p. 419–29, 2014.
- BAEKEN, M. W. *et al.* Novel insights into the cellular localization and regulation of the autophagosomal proteins LC3A, LC3B and LC3C. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2315, 2020.
- BAKIRTZI, K. *et al.* Treatment options and post-treatment malignant transformation rate of actinic cheilitis: A systematic review. **Cancers (Basel)**. v. 13, n. 13, p. 3354, 2021.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 1556p.

BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 6, n. 10, p. 656–64, 1920.

BRYNE, M. *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v. 166, n. 4, p. 375–81, 1992.

BRYNE, M. *et al.* New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 18, n. 8, p. 432–7, 1989.

CARDESA, A. *et al.* Squamous cell carcinoma. In: Barnes, L. *et al.* **World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors**. Lyon: IARC Press, 2005, p.118–121.

CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 3, p. 498–503, 2008.

CHEN, X. *et al.* Glucocorticoid receptor upregulation increases radioresistance and triggers androgen independence of prostate cancer. **Prostate**, v. 79, n. 12, p. 1386–98, 2019.

CHU, S. C. *et al.* Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation- dependent apoptosis and lc3-ii activation-dependent Autophagy. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. e101579, 2014.

CORREA, G. T. *et al.* Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations. **Tumour Biol.**, v. 36, n. 11, p. 9059–66, 2015.

COSTA, A. L. L.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; RAMOS, C. C. F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermoide oral. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 71, n. 2, p. 181–7, 2005.

CRISSMAN, J. D. *et al.* Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. **Cancer**, v. 54, n. 12, p. 2995–3001, 1984.

CHRUN, E. S. *et al.* Immunoexpression of HDAC1, HDAC2, and HAT1 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Dis.**, v. 23, n. 4, p. 505–10, 2017.

DE LIMA, T. B. *et al.* Autophagy analysis in oral carcinogenesis. **Pathol. Res. Pract.**, v. 213, n. 9, p. 1072–7, 2017.

DENG, J. *et al.* Autophagy inhibition prevents glucocorticoid-increased adiposity via suppressing BAT whitening. **Autophagy**, v. 16, n. 3, p.451-465, 2020.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. *et al.* Prevalence of and risk factors for actinic cheilitis in Brazilian fishermen and women. **Int. J. Dermatol.**, v. 53, n. 11, p. 1370–6, 2014.

DE SOUZA LUCENA, E. E. *et al.* Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis.**, v. 18, n. 6, p. 575–9, 2012.

DENNIS, P. B. *et al.* Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1102–5, 2001.

DOS SANTOS, J. N. *et al.* Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J. Cutan. Pathol.**, v. 30, n. 4, p. 237–41, 2003.

DURAN, A. *et al.* p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. **Mol. Cell.**, v. 44, n. 1, p. 134–46, 2011.

EL-NAGGAR, A. K. *et al.* **World Health Organization classification of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press; 2017.

FISHER, H. R. Grading of biopsies of laryngeal carcinomas by multiple criteria. **Can. J. Otaryngol.**, v. 4, n. 5, p. 881–4, 1975.

- GALE, N. *et al.* Epithelial precursor lesions. In: Barnes, L. *et al.* **World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005, p. 118–21.
- GANDHI, S. *et al.* Contribution of immune cells to glucocorticoid receptor expression in breast cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 13, p. 4635, 2020.
- GONÇALVES, A. S. *et al.* Relevance of HLA-G, HLA-E and IL-10 expression in lip carcinogenesis. **Hum Immunol.**, v. 77, n. 9, p. 785–90, 2016.
- GOVINDAN, M. V. *et al.* Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. **Nucl. Acids Res.**, v. 13, n. 23, p. 8293–304, 1985.
- GROSS, A. S.; GRAEF, M. Mechanisms of autophagy in metabolic stress response. **J. Mol. Biol.**, v. 432, n. 1, p. 28–52, 2020.
- GUTIÉRREZ-PASCUAL, M. *et al.* Squamous cell carcinoma of the lip: a retrospective study of 146 patients. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 26, n. 9, p. 1116–21, 2012.
- HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 6, p. 1259–62, 2008.
- HU, J. *et al.* The role of glucocorticoid receptor in prostate cancer progression: from bench to bedside. **Int. Urol. Nephrol.**, v. 49, n. 3, p. 369–80, 2017.
- JUNQUEIRA, J. L. *et al.* Actinic cheilitis among agricultural workers in Campinas, Brazil. **Community Dent. Health**, v. 28, n. 1, p. 60–3, 2011.
- KADEMANI, D. Oral cancer. **Mayo Clin. Proc.**, v. 82, n. 7, p. 878–87, 2007.
- KERAWALA, C. *et al.* Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. **J Laryngol Otol.**, v. 130, n.S2, p. 83-S89, 2016.

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

KLIONSKY, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) **Autophagy**. v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016.

KOCATURK, N. M. *et al.* Autophagy as a molecular target for cancer treatment. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 134, p. 116–37, 2019.

KOMATSU, M.; KAGEYAM, S.; ICHIMURA, Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. **Pharmacol. Res.**, v. 66, n. 6, p. 457–62, 2012.

KRISHNAMURTHI, S.; SHANTA, V.; SASTRI, D. V. L. N. Combined therapy in buccal mucosal cancers. **Radiology**, v. 99, n. 2, p. 409–15, 1971.

KRISTENSEN, R.N.; STEMANN ANDERSEN, P.; LOCK-ANDERSEN, J. Lip carcinoma: clinical presentation, surgical treatment, and outcome: a series of 108 cases from Denmark. **J. Plast. Surg. Hand. Surg.**, v. 51, n. 5, p. 342–7, 2017.

KUJAN, O. *et al.* Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol.**, v. 42, n. 10, p. 987–93, 2006.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran – Bases Patológicas das Doenças**. 9 ed. São Paulo: Elsevier, 2013. 928p.

LAMARK, T. *et al.* Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. **Essays Biochem.**, v. 61, n. 6, p. 609–24, 2017.

LEITE, A. F. *et al.* Immunoexpression of cleaved caspase-3 shows lower apoptotic area indices in lip carcinomas than in intraoral cancer. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 24, n. 4, p. 359–65, 2016.

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

- LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, 2008.
- LI, X.; HE, S.; MA, B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 12–27, 2020.
- LINDENBLATT, R. C. *et al.* Oral squamous cell carcinoma grading systems – analysis of the best survival predictor. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 41, n. 1, p. 34–9, 2012.
- LOPES, M.L.D.S. *et al.* Immune response and evasion mechanisms in lip carcinogenesis: An immunohistochemical study. **Arch. Oral Biol.**, v. 98, p. 99–107, 2019.
- LOPES, M. L. *et al.* Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 90, n. 4, p. 505–12, 2015.
- LOPES, M. L. *et al.* Correlation between cell cycle proteins and hMSH2 in actinic cheilitis and lip cancer. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 308, n. 3, p. 165–71, 2016.
- LOURENÇO, S. Q. C. *et al.* Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 325–33, 2007.
- LU, Y. S. *et al.* Glucocorticoid receptor expression in advanced non-small cell lung cancer: clinicopathological correlation and in vitro effect of glucocorticoid on cell growth and chemosensitivity. **Lung Cancer**, v. 53, n. 3, p. 303–10, 2006.
- MARKOPOULOS, A. *et al.* Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis.**, v. 10, n. 4, p. 212–6, 2004.
- MARUCCIA, M. *et al.* Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 4, p. 1543–6, 2012.

MAYCOTTE, P.; THORBURN, A. Autophagy and cancer therapy. **Cancer Biol. Ther.**, v. 11, n. 2, p. 127–37, 2011.

McBETH, L. *et al.* Involvement of the androgen and glucocorticoid receptors in bladder cancer. **Int. J. Endocrinol.**, v. 2015, p. 384860, 2015.

MELLO, F.W. *et al.* Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil. **J. Clin. Exp. Dent.**, v. 11, n. 1, p. e62-e69, 2019.

MIHAILIDOU, C. *et al.* Crosstalk between C/EBP homologous protein (CHOP) and glucocorticoid receptor in lung cancer. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 436, p. 211–23, 2016.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728–41, 2011.

MOECKELMANN, N. *et al.* Prognostic implications of the 8th edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system in oral cavity squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 85, p. 82–6, 2018.

MOREIRA, D. G. L. *et al.* Immunohistochemical expression of DNA repair proteins in oral tongue and lower lip squamous cell carcinoma. **Braz. Oral Res.**, v. 34, p. e101, 2020.

MORENO-GALINDO, C. *et al.* P27 and BCL2 expression predicts response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 2, p. 128–34, 2014.

MORSELLI, P. *et al.* Clinical parameters in T1N0M0 lower lip squamous cell carcinoma. **J. Craniof. Surg.**, v. 18, n. 5, p. 1078–82, 2007.

MUSE, M. E.; CRANE, J. S. **Actinic Cheilitis. In: StatPearls [Internet].** Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

NETEA-MAIER, R. T. *et al.* Autophagy in thyroid cancer: present knowledge and future perspectives. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 18, p. 22, 2015.

NEVILLE, B.W. *et al.* **Oral and maxillofacial pathology**. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2016.

OLIVEIRA ALVES, M. G. *et al.* Study of MDM2 and SUMO-1 expression in actinic cheilitis and lip cancer. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 306, n. 9, p. 837–41, 2014.

OZTURK, K. *et al.* Squamous cell carcinoma of the lip: survival analysis with long-term follow-up. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 272, n. 11, p. 3545–50, 2014.

PEÑA-OYARZÚN, D. *et al.* Role of autophagy in the microenvironment of oral squamous cell carcinoma. **Front. Oncol.**, v. 10, p. 602661, 2020.

PEURALA, E. *et al.* Eosinophilia is a favorable prognostic marker for oral cavity and lip squamous cell carcinoma. **APMIS**. v. 126, n. 3, p. 201–7, 2018.

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

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

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. **Endocr. Dev.**, v. 24, p. 41–56, 2013.

REIBEL, J. *et al.* Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: El-Naggar, A. K. *et al.* **WHO classification of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2017, p. 112–15.

RELIC, B. *et al.* BAY 11-7085 induces glucocorticoid receptor activation and autophagy that collaborate with apoptosis to induce human synovial fibroblast cell death. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23370–82, 2016.

RIO, E. *et al.* Interstitial brachytherapy for lower lip carcinoma: global assessment in a retrospective study of 89 cases. **Head Neck**, v. 35, n. 3, p. 350–3, 2013.

- RODRÍGUEZ-BLANCO, I. *et al.* Actinic cheilitis prevalence and risk factors: A cross-sectional, multicentre study in a population aged 45 years and over in North-west Spain. **Acta Derm. Venereol.**, v. 98, n. 10, p. 970–4, 2018.
- RODRÍGUEZ-BLANCO, I. *et al.* Actinic cheilitis: Analysis of clinical subtypes, risk factors and associated signs of actinic damage. **Acta Derm. Venereol.**, v. 99, n. 10, p. 931–2, 2019.
- RON, E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. **Radiat. Res.**, v. 150, n. 5, p. S30–41, 1998.
- ROSEBUSH, M. S. *et al.* Oral cancer: enduring characteristics and emerging trends. **J. Tenn. Dent. Assoc.**, v. 91, n. 2, p. 24–7, 2011.
- SAIYIN, W. *et al.* Sequential release of autophagy inhibitor and chemotherapeutic drug with polymeric delivery system for oral squamous cell carcinoma therapy. **Mol. Pharm.**, v. 11, n. 5, p. 1662–75, 2014.
- SAKAKURA, K. *et al.* Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.**, v. 106, n. 1, p. 1–8, 2015.
- SALGARELLI, A. C. *et al.* Surgical treatment of lip cancer: our experience with 106 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 67, n. 4, p. 840–5, 2009.
- SARGERAN, K. *et al.* Survival after lip cancer diagnosis. **J. Craniofac. Surg.**, v. 20, n. 1, p. 248–52, 2009.
- SATO, M. *et al.* Glucocorticoids negatively regulates chaperone mediated autophagy and microautophagy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 528, n. 1, p. 199–205, 2020.
- SAVAGE, N. W.; MCKAY, C.; FAULKNER, C. Actinic cheilitis in dental practice. **Aust. Dent. J.**, v. 55, n. 1, p. 78–84, 2010.

SCHAAF, M. B. *et al.* LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un) related functions. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 12, p. 3961–78, 2016.

SCHUSSEL, J. L.; PINTO JÚNIOR, D. S.; MARTINS, M. T. Altered  $\beta$ -catenin expression related to cancer progression on actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. **Ann. Diagn. Pathol.**, v. 15, n. 1, p. 1–5, 2011.

SENA, L. S. B. *et al.* Immunoexpression of glucocorticoid receptor alpha (GR $\alpha$ ) isoform and apoptotic proteins (Bcl-2 and Bax) in actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 47, n. 8, p. 788–95, 2018.

SENA, L. S. B. *et al.* Immunoexpression of human leukocyte antigen-DR in actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma. **Braz. Oral Res.**, v. 33, p. e085, 2019.

SEOANE, J. *et al.* Assembling a consensus on actinic cheilitis: A Delphi study. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 50, n. 10, p. 962–70, 2021.

SILVA, L. V. O. *et al.* Demographic and clinicopathologic features of actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: a Brazilian multicentre study. **Head Neck Pathol.**, v. 14, n. 4, p. 899–908, 2020.

SILVA, L. A. B. D. *et al.* Histopathologic grading and its relationship with outcome in oral tongue squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 50, n. 2, p. 183-190, 2021.

SILVEIRA, E. J. D. *et al.* Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 376–83, 2007.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. 6th ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. 264p.

SOUZA, R. L. *et al.* Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 16, n. 6, p. e757–62, 2011.

- SUNDAHL, N. *et al.* Selective glucocorticoid receptor-activating adjuvant therapy in cancer treatments. **Oncoscience**, v. 3, n. 7–8, p. 188–202, 2016.
- TANG, J. Y. *et al.* High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. **Hum. Pathol.**, v. 44, n. 11, p. 2558–62, 2013.
- TERABE, T. *et al.* Expression of autophagy-related markers at the surgical margin of oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and tumor recurrence. **Hum. Pathol.**, v. 73, p. 156–63, 2018.
- TOPRANI, S. M.; KELKAR MANE, V. A short review on DNA damage and repair effects in lip cancer. **Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.**, v.17, p. S1658-3876, 2021.
- TRONCOSO, R. *et al.* Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. **Cell Cycle**, v. 13, n. 14, p. 2281–95, 2014.
- VANDERLEI, J. P. *et al.* Management of neck metastases in T2N0 lip squamous cell carcinoma. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 34, n. 2, p. 103–6, 2013.
- VARELA-CENTELLES, P. *et al.* Therapeutic approaches for actinic cheilitis: therapeutic efficacy and malignant transformation after treatment. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 49, n. 10, p. 1343–50, 2020.
- VIEIRA, R. A. *et al.* Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An. Bras. Dermatol.**, v. 87, n. 1, p. 105–14, 2012.
- VIVIANO, M; ADDAMO, A; LORENZINI, G. Oral cancer. **Int. J. Clin. Dent.**, v. 6, n. 3, p. 291–311, 2013.
- VUKADINOVIC, M. *et al.* Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 65, n. 4, p. 675–90, 2007.

WAHI, P. M. Tipos histologicos de tumors orales y orofaringeos. Giebra. **Organizacion Mundial de la Salud**, 1971.

WALTON, E.; CRAMER, J. D. Predictors of occult lymph node metastases in lip cancer. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 41, n. 3, p. 102419, 2020.

WARNAKULASURIYA, S. *et al.* Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 3, p. 127–33, 2008.

WARNAKULASURIYA, S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 125, n. 6, p. 582–90, 2018.

WEATHERSPOON, D. J. *et al.* Oral cavity and oropharyngeal cancer incidence trends and disparities in the United States: 2000-2010. **Cancer Epidemiol.**, v. 39, n. 4, p. 497–504, 2015.

WITTEKIND, C. *et al.* TNM residual tumor classification revisited. **Cancer**, v. 94, n. 9, p. 2511–6, 2002.

YAKIREVICH, E. *et al.* Expression of the glucocorticoid receptor in renal cell neoplasms: in immunohistochemical and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. **Hum. Pathol.**, v. 42, n. 11, p. 1684–92, 2011.

YANG, Y. *et al.* Increased expression of lncRNA CASC9 promotes tumor progression by suppressing autophagy-mediated cell apoptosis via the AKT/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma. **Cell Death Dis.**, v. 10, n. 2, p. 41, 2019.

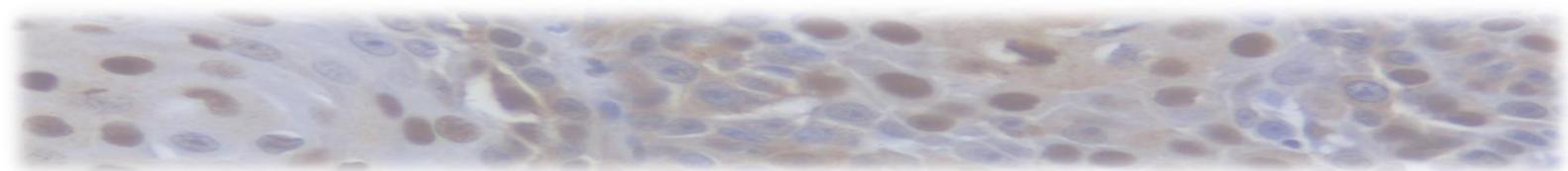
YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nat. Cell Biol.**, v. 12, n. 9, p. 814–22, 2010.

YOON, M. S. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. E1176, 2017.

YÜCEL, A. *et al.* Predictive factors of late neck metastasis in early stage lip cancer followed by "wait and see" policy. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 41, n. 5, p. 102556, 2020.

YUN, C. W.; LEE, S. H. The roles of autophagy in cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 11, p. 3466, 2018.

ZHAO, X. M. *et al.* Significance of glucocorticoid receptor expression in patients with non-small cell lung cancer treated with pemetrexed-based chemotherapy. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 80, n. 4, p. 851–60, 2017.



## ANEXOS

## 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:** RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE E PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA NA CARCINOGÊNESE LABIAL

**Pesquisador:** Cassiano Francisco Weege Nonaka

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 08340819.9.0000.5187

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.175.815

**Apresentação do Projeto:**

O estudo consistirá em uma pesquisa observacional, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunoproteínas das proteínas RGA, Atg7, LC3, p62 e mTOR em casos de mucosa normal, QA e CCE de lábio inferior. O projeto apresenta-se bem formatado e com boa justificativa

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a imunoproteína da RGA e de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3, p62 e mTOR) em casos de mucosa normal, QA e CCE de lábio inferior. Pretende-se, com esta pesquisa, fornecer subsídios para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese labial.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Em se tratando de uma pesquisa apresenta riscos mínimos, e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivo. Apresenta como maior benefício esperado, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese labial.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A proposta do projeto é relevante que visa adicionar ao conhecimento da etiopatogênese das neoplasias de lábio e desta for fornecendo subsídios para uma possível aplicação da autofagia como alvo potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para QAs e CCEs de lábio inferior.

**Endereço:** Av. das Baraúnas, 351- Campus Universitário

**Bairro:** Bodocongó

**CEP:** 58.109-753

**UF:** PB

**Município:** CAMPINA GRANDE

**Telefone:** (83)3315-3373

**Fax:** (83)3315-3373

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

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



Continuação do Parecer: 3.175.815

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

O projeto apresenta todos os termos de apresentação obrigatórios.

**Recomendações:**

O projeto apresenta relevância, 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 o envio do Relatório da Pesquisa, após a sua execução.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1275555.pdf	21/02/2019 13:25:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_Adequacoes.pdf	21/02/2019 13:25:27	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Adequacoes.pdf	21/02/2019 13:25:06	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	18/02/2019 10:28:35	Luana Samara Balduino de Sena	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoUEPB.pdf	11/02/2019 21:59:13	Luana Samara Balduino de Sena	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoLaureano2.pdf	11/02/2019 21:59:03	Luana Samara Balduino de Sena	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoLaureano1.pdf	11/02/2019 21:58:49	Luana Samara Balduino de Sena	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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

**ANEXO B** – Normas para submissão de trabalhos no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*.

**Author Guidelines**

Sections

1. Submission
2. Aims and Scope
3. Manuscript Categories and Requirements
4. Preparing the Submission
5. Editorial Policies and Ethical Considerations
6. Author Licensing
7. Publication Process After Acceptance
8. Post Publication
9. Editorial Office Contact Details

**1. SUBMISSION**

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal <https://wiley.atyponrex.com/journal/JOP>. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at anytime by logging on to [submission.wiley.com](https://www.wiley.com) and clicking the “My Submissions” button. For technical help with the submission system, please review our FAQs or contact [submissionhelp@wiley.com](mailto:submissionhelp@wiley.com).

**Free format submission**

Journal of Oral Pathology & Medicine now offers Free Format submission for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

Your manuscript: this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files—whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for revision. Your manuscript may also be sent back to you for revision if the quality of English language is poor. · An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. (Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.

**The title page of the manuscript, including:**

Your co-author details, including affiliation and email address. (Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.)

Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following (Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication):

data availability statement

funding statement

conflict of interest disclosure

ethics approval statement

patient consent statement

permission to reproduce material from other sources

clinical trial registration

**Data protection**

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

**Preprint policy**

Please find the Wiley preprint policy here.

This journal accepts articles previously published on preprint servers.

Journal of Oral Pathology & Medicine will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact: [JOPM.office@wiley.com](mailto:JOPM.office@wiley.com)

**2. AIMS AND SCOPE**

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. The journal does not usually consider papers on periodontal or related diseases. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages.

All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

### 3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

#### i. Original Research Articles

Journal of Oral Pathology & Medicine welcomes Original Research Articles of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

Word limit: 3,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Background, Methods, Results, Conclusion. Should not contain abbreviations.

References: Maximum of 30 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and/or tables.

Main Text Structure: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion:

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

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

Please see the Editorial Policies and Ethical Considerations section for requirements related to Clinical Trials, Experimental Subjects and Suppliers.

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

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

#### ii. Review Articles

Journal of Oral Pathology & Medicine commissions review articles and also welcomes uninvited reviews. Reviews are subject to peer-review.

Word limit: 3,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum. Should not contain abbreviations. Please choose headings appropriate for the article.

References: Maximum of 50 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and/or tables.

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

### **iii. Systematic Reviews**

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

While the content of a systematic review will be partly determined by the topic and evidence, as a minimum the review should:

Clearly state the purpose of the review

Determine inclusion and exclusion criteria to generate a PRISMA flowchart that includes identification of studies, screening, eligibility and inclusion data (See Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J et al, The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ* 2009; 339: b2700)

Determine the primary end point of the review ie. acceptance or rejection of the null hypothesis

Clearly describe the search methodology [databases (preferably more than one), search terms]

Describe the process of data extraction

Undertake statistical assimilation if appropriate

Evaluate the quality and/or risk of bias of the studies included preferably using a standard assessment tool (See Guyatt, GH, Oxman AD, Vist GE et al. *GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. BMJ* 2008; 336: 924-926

Provide recommendations for future researches

Word limit: 3,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum. Should not contain abbreviations. Please choose headings appropriate for the article.

References: Maximum of 50 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and/or tables.

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

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

### **iv. Brief Reports**

Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports.

Word limit: 1,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum. Should not contain abbreviations. Please choose headings appropriate for the article.

References: Maximum of 10 references.

Figures/Tables: Total of no more than 3 figures and tables.

#### **v. Letters to the Editor**

Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in Journal of Oral Pathology & Medicine or they may raise new issues, but should have important implications.

Word limit: 750 words maximum, excluding abstract and references.

References: Maximum of 5 references.

Figures/Tables: Total of no more than one figure and table.

**Case Reports: Please note that Journal of Oral Pathology & Medicine no longer accepts submissions of case reports. The journal also does not accept case reports with an extensive literature review.**

## **4. PREPARING THE SUBMISSION**

### **Cover Letters**

Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion.

### **Parts of the Manuscript**

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

### **Main Text File**

Manuscripts can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) format.

### **The text file should be presented in the following order:**

Your main document file should include:

A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations

The full names of the authors with institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;

Acknowledgments;

Abstract structured (intro/methods/results/conclusion) or unstructured

Up to seven keywords;

Main body: formatted as introduction, materials & methods, results, discussion, conclusion

References;

Tables (each table complete with title and footnotes);

Figures: Figure legends must be added beneath each individual image during upload AND as a complete list in the text.

### **Authorship**

Please refer to the journal's authorship policy the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on eligibility for author listing.

### **Acknowledgments**

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

### **Conflict of Interest Statement**

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

### **Abstract**

Abstracts and keywords are required for some manuscript types. For details on manuscript types that require abstracts, please refer to the 'Manuscript Types and Criteria' section.

### **Keywords**

Please provide 2-5 keywords. Authors are encouraged to choose keywords from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh).

### **References**

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. For more information about AMA reference style please consult the AMA Manual of Style

#### **Sample references follow:**

Journal article

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

Book

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Internet document

3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2003*. <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf> Accessed March 3, 2003

**Tables**

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

**Figure Legends**

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

**Figures**

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

Click here for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Color Figures. Figures submitted in color may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

**Reproduction of Copyright Material**

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is the author's responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ at [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-terms--conditions\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-terms--conditions_301.html)

**Data Citation**

Please review Wiley's data citation policy here.

**Additional Files****Appendices**

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

**Supporting Information**

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

[Click here for Wiley's FAQs on supporting information.](#)

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

### **General Style Points**

The following points provide general advice on formatting and style.

**Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only. Use only standard abbreviations. Useful is Baren DN, ed. *Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors.* 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

**Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.

Use no roman numerals in the text.

In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used.

### **Wiley Author Resources**

**Manuscript Preparation Tips:** Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

**Article Preparation Support:** Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

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

## **5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS**

### **Peer Review and Acceptance**

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Manuscripts are single-blind or transparent peer reviewed, depending on the choice of the authors. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available [here](#).

### **Transparent Peer Review**

This journal is participating in the Peer Review Transparency project. By submitting to this journal, authors agree that the reviewer reports, their responses, and the editor's decision letter will be linked from the published article to where they appear on Publons in the case that the

article is accepted. Authors have the opportunity to opt out during submission, and reviewers may remain anonymous unless they would like to sign their report.

### **Appeal of Decision**

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

### **Human Studies and Subjects**

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: Declaration of Helsinki; US Federal Policy for the Protection of Human Subjects; or European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice. It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. When detailed descriptions, photographs, or videos of faces or identifiable body parts are used that may allow identification, authors should obtain the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a standard patient consent form available for use. Where photographs are used they need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized; black eye bars should not be used as they do not sufficiently protect an individual's identity).

### **Animal Studies**

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the ARRIVE guidelines for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).

European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

### **Suppliers**

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

### **Clinical Trial Registration**

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

### **Research Reporting Guidelines**

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to recognised research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

#### **Randomised trials : CONSORT**

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

#### **Observational studies : STROBE**

#### **Systematic reviews : PRISMA or PROSPERO**

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

Case reports : CARE

Qualitative research : SRQR

Diagnostic / prognostic studies : STARD

Quality improvement studies : SQUIRE

Economic evaluations : CHEERS

Animal pre-clinical studies : ARRIVE

Study protocols : SPIRIT

Clinical practice guidelines : AGREE

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

Future of Research Communications and e-Scholarship (FORCE11)

National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines

The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues

Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website

FAIRsharing website

### **Conflict of Interest**

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory

board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

### **Conflict of Interest Disclosure Form**

The form above does not display correctly in the browsers. If you see an error message starting with "Please wait...", we recommend that you download the file to your computer. Saving a local copy on your computer should allow the form to work properly.

### **Funding**

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

### **Authorship**

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; and

Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and

Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and

Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options. Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. ‘X and Y should be considered joint first author’ or ‘X and Y should be considered joint senior author.’

### **Data Sharing and Data Accessibility**

Journal of Oral Pathology & Medicine expects that data supporting the results in the paper will be archived in an appropriate public repository. Authors are required to provide a data availability statement to describe the availability or the absence of shared data. When data have been shared, authors are required to include in their data availability statement a link to the repository they have used, and to cite the data they have shared. Whenever possible the scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper should also be publicly archived. If sharing data compromises ethical standards or legal requirements then authors are not expected to share it.

See the Standard Templates for Author Use to select an appropriate data availability statement for your dataset.

### **Publication Ethics**

This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Note this journal uses iThenticate’s CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley’s Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors here. Wiley’s Publication Ethics Guidelines can be found here.

### **ORCID**

As part of the journal’s commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more information here.

## **6. AUTHOR LICENSING**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal’s standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available here. To review the Creative Commons License options offered under Open Access, please click here. (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click here.)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal’s standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click here for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish using Open Access you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please [click here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

## **7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE**

### **Accepted article received in production**

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with Wiley Author Services. The author will be asked to sign a publication license at this point.

### **Accepted Articles**

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

### **Proofs**

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

### **Publication Charges**

Page Charges. Articles exceeding 8 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters. In case an article exceeds 8 pages including references the author will be invoiced after publication.

### **Early View**

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. Early View (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

## **8. POST PUBLICATION**

Access and sharing

When the article is published online:

The author receives an email alert (if requested).

The link to the published article can be shared through social media.

The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).

The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

### **Promoting the Article**

To find out how to best promote an article, [click here](#).

### **Article Promotion Support**

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

### **Measuring the Impact of an Article**

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with Kudos and Altmetric.

### **Wiley's Author Name Change Policy**

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

## **9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS**

For queries about submissions, please contact [JOPM.office@wiley.com](mailto:JOPM.office@wiley.com)

Author Guidelines Updated 08 February 2021

