



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

THINALI SOUSA DANTAS

**PERFIL DA IMUNOEXPRESSIONE DE RECEPTORES OPIOIDES EM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS E NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE BOCA E OROFARINGE E CORRELAÇÃO CLÍNICO-
PATOLÓGICA COM MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E MORTE
CELULAR**

FORTALEZA

2021

THINALI SOUSA DANTAS

**PERFIL DA IMUNOEXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES EM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS E NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE BOCA E OROFARINGE E CORRELAÇÃO CLÍNICO-
PATOLÓGICA COM MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E MORTE
CELULAR**

Tese de Doutorado apresentada à banca
avaliadora para obtenção parcial de título de
Doutor em Odontologia.

Orientador: Fabrício Bitu Sousa

FORTALEZA

2021

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D216p Dantas, Thinali Sousa.
Perfil da imunoexpressão de receptores opioides em lesões potencialmente malignas e no carcinoma de células escamosas de boca e orofaringe e correlação clínico-patológica com marcadores de proliferação e morte celular / Thinali Sousa Dantas. – 2021.
92 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.

1. Receptores Opioides. 2. Sobrevida. 3. Carcinoma de Células Escamosas. I. Título.

CDD 610.73

THINALI SOUSA DANTAS

PERFIL DA IMUNOEXPRESSIONE DE RECEPTORES OPIOIDES EM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS E NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
DE BOCA E OROFARINGE E CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA COM
MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR

Tese de Doutorado apresentada à banca
avaliadora para obtenção parcial de título
de Doutor em Odontologia.

Aprovado em 23/07/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz André Cavalcante Brizeno
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Dra. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha Cunha
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Dra. Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

DEDICATÓRIA

A Deus,

Aos meus pais, Auciani e Alcivan,

Aos meus mestres.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não representa apenas a finalização de uma pesquisa, mas sim o fim de um ciclo de 12 anos, iniciado em 2009, com a minha entrada no curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, e o início de um novo na minha vida profissional. Durante todo esse período, várias pessoas passaram pelo meu caminho, algumas delas marcaram minha história acadêmica, e é a elas que eu agradeço.

Primeiramente, sem sombra de dúvidas, sou grata a Deus, que me sustenta, me deu a vida e que conhece cada segundo dela, traçando meu destino e estando comigo nos melhores e piores momentos desta jornada.

Aos meus pais, Auciani e Alcivan, que nunca mediram esforços para me proporcionar educação, amparo financeiro e emocional, que me criaram e me amaram incondicionalmente.

Ao Davyd, meu namorado, que está comigo há exatamente o mesmo tempo em que minha trajetória começou, sempre ao meu lado, segurando minha mão em todos os momentos e nos mais difíceis, sendo a força de que eu precisava.

Aos meus colegas de pós-graduação e trabalho. Sem eles, certamente não teria conseguido. Em especial, a Isabelly, Karine e Paulinho, que viraram meus irmãos. Com eles, aprendi a ser melhor e que nada se consegue sozinho. Rimos, choramos e vencemos juntos.

Ao Osias, Iana, Livia e Ana Clara, que foram gratas surpresas em meu caminho, sem eles este trabalho não teria sido finalizado. Desejo todo o sucesso do mundo para todos eles que ainda estão nesta jornada.

Agradeço ao Hospital Haroldo Juaçaba, representado para mim pela Dr. Patty, pela oportunidade de realização deste trabalho, de aprendizado e convivência, e também à professora Renata Leitão, por ter depositado em mim a confiança para a elaboração e finalização desta pesquisa.

Aos meus mestres: Prof.^a Ana Paula, uma mulher forte e admirável, nosso exemplo de perseverança na pesquisa dentro da universidade pública, por sempre estar presente quando precisei de sua orientação; Prof. Mário, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência e tranquilidade durante todo esse tempo e por toda a sua orientação; e em especial, ao Prof. Fabrício Bitu, meu orientador, que, desde o meu quarto semestre de graduação, me acompanha, me guia, e proporcionou as melhores oportunidades que eu poderia ter. Sempre falo aos colegas que tenho sorte em tê-lo na minha vida. Não tenho palavras o suficiente para demonstrar minha gratidão e admiração.

A todos, meu Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) representa 95% das neoplasias malignas de boca e orofaringe. O prognóstico desse tumor está relacionado ao seu estadiamento. Estágios mais avançados são responsáveis pela menor sobrevida dos pacientes e maior sofrimento, sendo este minimizado pelo uso de analgésicos opioides. A ação desses fármacos junto ao sistema nervoso central está bem definida, porém pouco se sabe da sua ação em células tumorais. Portanto, este trabalho é constituído por dois capítulos e propõe, por meio de estudos retrospectivos, caracterizar o perfil da imunexpressão de receptores opioides Mu (μ) (RMO), Kappa (κ) (RKO) em epitélio de mucosa oral, lesão potencialmente maligna (LPM) e CCE de boca e orofaringe, além de correlacionar essa imunexpressão com fatores prognósticos, marcadores de proliferação e morte celular. No capítulo 1, foram avaliadas 25 amostras de epitélio de mucosa oral, 25 amostras de LPM com displasia, 50 amostras de CCE de boca, oriundas do Instituto do Câncer do Ceará (ICC), por meio de imuno-histoquímica para receptores Mu opioide, Kappa opioide e Ki67. No capítulo 2, foram avaliados 50 pacientes com CCE de orofaringe tratados no ICC por meio de imuno-histoquímica para receptores Mu opioide, Kappa opioide, Ki67 e Caspase-3. Em ambos, foram coletados dados sociodemográficos e clínico-patológicos. Foi verificado o percentual de células epiteliais exibindo imunomarcagem através do *software* ImageJ, e dados clínico-patológicos e prognósticos foram avaliados. Os dados foram analisados pelos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis/Dunn, correlação de Spearman, Log-Rank Mantel-Cox e regressão de Cox. No capítulo 1, as amostras de boca mostram aumento da imunexpressão dos marcadores em LPMs e CCEs em comparação com epitélio de mucosa oral, principalmente em núcleo e citoplasma e para o Ki67 foi considerado marcação nuclear. Características clínicas como sexo, idade, histórico de fumo, etilismo e localização do tumor primário não influenciaram na imunexpressão para os receptores opioides. Observou-se uma menor expressão de RMO em tumores T1 e maior imunexpressão de RKO citoplasmática nos pacientes que foram a óbito. No capítulo 2, em orofaringe, a imunexpressão para RMO, RKO, Ki67 e Caspase-3 foram significativamente superiores nos tumores primários e metástases linfonodais de tumores p16+ e p16- em comparação às margens cirúrgicas. Observou-se que a menor

expressão de Caspase-3 influencia positivamente a sobrevida dos pacientes; em análise multivariada, a expressão nuclear de RMO opioide foi diretamente associada a menor risco de morte, e a expressão nuclear de RKO com maior risco. Assim, parece que receptores opioides estão diretamente relacionados ao prognóstico dos CCEs de boca e orofaringe, porém os mecanismos pelos quais esses receptores atuam na proliferação e morte celular tumoral ainda são obscuros.

Palavras-chave: Receptores Opioides, Sobrevida, Carcinoma de Células Escamosas

ABSTRACT

Squamous Cell Carcinoma (SCC) accounts for approximately 95% of all oral and oropharyngeal malignancies. The prognosis of this tumor is stage dependent. More advanced stages result in shorter patient survival as well as greater suffering, which can be minimized with opioid analgesics. Although the effects of these drugs on the central nervous system are well established, little is known about their action on tumor cells. Therefore, the aim of this retrospective study, divided in two chapters, was to characterize the immunoexpression profile of Mu (μ) (MOR), Kappa (κ) (KOR) opioid receptors in oral mucosa epithelium (OME), oral potentially malignant lesions (OPML), and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OOSCC), as well as to correlate these immunoexpression findings with prognostic factors, proliferation, and cell death markers. In Chapter 1, we analyzed 25 OME samples and 25 OPML samples with dysplasia and 50 oral SCC samples from the Cancer Institute of Ceará (CIC) by immunohistochemistry for Mu opioid, Kappa opioid and Ki67 receptors. In Chapter 2, 50 patients with oropharyngeal SCC treated at the CIC were evaluated by immunohistochemistry for Mu opioid, Kappa opioid, Ki67 and caspase-3 receptors. In both chapters, sociodemographic and clinicopathological data were collected. The percentage of epithelial cells exhibiting immunostaining was evaluated with the ImageJ software in association with clinical-pathological and prognostic data. The data were analyzed with Mann-Whitney, Kruskal-Wallis / Dunn tests, Spearman correlation, Log-Rank Mantel-Cox, and Cox regression. In Chapter 1, oral samples showed increased immunoexpression of both opioid receptors in OPML and OOSC compared to OME, mainly in the nucleus, cytoplasm, and perinuclear membrane. For the Ki67 it was considered nuclear marking. Clinical characteristics such as sex, age, smoking history, alcohol consumption, and location of the primary tumor did not influence the immunoexpression of opioid receptors. A lower expression of MOR was observed in T1 tumors, whereas a greater immunoexpression of cytoplasmic KOR was observed in deceased patients. In Chapter 2, in the oropharynx, the immunoexpression of MOR, KOR, Ki67, and caspase-3 were significantly higher in primary tumors and lymph node metastases from p16 + and p16- tumors compared to surgical margins. It was observed that the lower expression of caspase-

3 negatively influenced the survival of patients, and, in multivariate analysis, nuclear expression of MOR was directly associated with lower risk of death, whereas nuclear expression of KOR was associated with a higher risk. Thus, it appears that opioid receptors are directly related to the carcinogenesis and the prognosis of OOSCC; however, the mechanisms by which these receptors affect tumor cell proliferation and death remain unclear.

Keywords: Opioid Receptors, Survival, Squamous Cell Carcinoma.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Câncer de Boca e Orofaringe: Epidemiologia.....	1
1.2 Características Clínicas, Marcadores Biológicos e Prognósticos	2
1.3 Receptores Opioides e Progressão Tumoral.....	4
1.4 Receptores Opioides no Carcinoma de Células Escamosas.....	6
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo Geral.....	9
2.2. Objetivos Específicos.....	9
3. CAPÍTULOS	10
3.1. Capítulo 1	11
3.2 Capítulo 2.....	34
4. CONCLUSÃO GERAL.....	57
5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	58
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	64
ANEXO 3.....	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Câncer de Boca e Orofaringe: Epidemiologia

O câncer representa uma doença de grande preocupação devido à sua alta incidência e elevada mortalidade, sendo, atualmente, considerado a segunda maior causa de morte no mundo, ultrapassado apenas pelas doenças coronarianas (INCA, 2020). Devido a isso, apresenta grande relevância em pesquisas científicas e tem sido grande alvo de inúmeros estudos e investigações. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes relacionadas e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de média e baixa renda (INCA, 2020).

Em países com grande volume de recursos financeiros, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon. Em países de baixo e médio recursos, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade oral e colo de útero. Mesmo na tentativa de se criarem padrões mais característicos de países ricos em relação aos de baixa e média renda, o padrão está mudando rapidamente, e vem-se observando um aumento progressivo dos cânceres de pulmão, mama, cólon e reto, os quais, historicamente, não apresentavam essa importância e magnitude (INCA, 2020).

O câncer oral e de orofaringe, agrupados, são o sexto tipo de câncer mais comum no mundo. Em países de alto risco, como Sri Lanka, Índia, Paquistão e Bangladesh, o câncer bucal é o câncer mais comum em homens, contribuindo com até 25% de todos os novos casos (DANTAS et al., 2016; BUGSHAN 2020).

No Brasil, o câncer gera enormes gastos ao Sistema Único de Saúde (SUS). Esse tema ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e, com isso, conquista espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo (INCA, 2020).

O câncer oral é uma doença grave e de incidência crescente. Essas lesões, muitas vezes, são diagnosticadas tardiamente, o que leva a um prognóstico pobre. Por conseguinte, o tratamento é mutilante, gerando sequelas estéticas e funcionais, com grande impacto sobre a qualidade de vida e a saúde psicológica dos pacientes acometidos. Isso faz do diagnóstico precoce um fator determinante na sobrevivência e qualidade de vida da população com essa condição (THOMSON et al., 2018; MACHIELS et al., 2020).

1.2 Características Clínicas, Marcadores Biológicos e Prognósticos

O tipo histológico mais prevalente no câncer de boca e de orofaringe é o carcinoma de células escamosas (CCE), que representa aproximadamente 95% das neoplasias malignas dessa região e cerca de 38% dos tumores malignos de cabeça e pescoço, sendo o subtipo histológico moderadamente diferenciado o mais frequente. O risco de desenvolvimento dessa lesão aumenta com a idade, e a maioria dos casos ocorre em indivíduos acima de 50 anos (ZINI et al., 2010).

A etiologia do câncer de boca é razoavelmente bem definida, vários agentes têm sido implicados no seu desenvolvimento, no qual a combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos parece ampliar o seu potencial de estimulação na divisão celular que, de maneira desregulada, dá origem ao tumor (BJERKLI et al., 2020). São fatores etiológicos que podem ser associados a essa neoplasia: tabaco, álcool, susceptibilidade genética, agentes infecciosos, radiação, lesões potencialmente malignas (LPMs), má nutrição e alguns fatores ocupacionais. Os principais fatores de risco são o tabagismo e o consumo de álcool. Quando associados, podem aumentar o efeito carcinogênico (BJERKLI et al., 2020). Lábio, língua e soalho bucal são as localizações comuns, tendo o câncer de lábio um melhor prognóstico (mais de 90% dos pacientes vivendo por cinco anos) em comparação aos tumores de outros sítios (LYDIATT et al., 2017).

O câncer de orofaringe possui etiologia delineada. O fumo de tabaco associado a álcool é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento desses tumores, porém já é bem definida a relação de causalidade com o papiloma vírus humano (HPV) (LYDIATT et al., 2017). Práticas de sexo desprotegido e aumento da idade elevam também a incidência do câncer de orofaringe (NGUYEN et al., 2014). As principais localizações são base da língua, tonsilas linguais e paredes laterais/posteriores da orofaringe (MORO et al., 2018). Além disso, a idade atua como importante predisponente e, quando há associação ao HPV, o prognóstico mostra-se significativamente melhor que os casos não associados ao HPV (LYDIATT et al., 2017).

Em ambos os tipos, o CCE evolui a partir de um complexo processo resultante da exposição a agentes carcinogênicos, que inclui várias etapas constituídas de mudanças genéticas, epigenéticas e metabólicas. Exposição crônica a esses agentes leva a instabilidade genética nas células epiteliais, com desenvolvimento de LPM e, posteriormente, ao carcinoma invasivo (DANCYGER et al., 2018). As LPMs estão

associadas ao processo de carcinogênese por conta de suas alterações displásicas. As leucoplasias e eritroplasias são as principais desordens envolvidas no surgimento de lesões malignas intraorais e de orofaringe, e a queilite actínica em lábio (DANCYGER et al., 2018).

Os prognósticos do câncer de boca e de orofaringe são significativamente distintos, o que se deve provavelmente aos seus diferentes comportamentos biológicos (PARARESE et al., 2019). CHEN et al. (2012) observaram que a sobrevida de pacientes com câncer de boca é quase duas vezes menor que a sobrevida dos pacientes com câncer de orofaringe e que, inclusive, a resposta à radioterapia é diferente, apresentando melhor resposta terapêutica e, por conseguinte, melhor prognóstico em lesões de orofaringe.

Apesar de um prognóstico nitidamente diferente, a diferença entre o comportamento biológico dos tumores nas diversas localizações ainda não é bem definido. A expressão de proteínas de proliferação celular convencionais como o Ki67 pode mostrar diferença significativa entre esses dois tipos de cânceres. Proteínas associadas a degradação do microambiente tumoral como colágeno tipo IV e alfa-actina de músculo liso também não mostram comportamento diferente entre ambos (RIVERA et al., 2014). Todavia, perspectivas distintas surgem quando proteínas afetadas pelo HPV são estudadas, como a proteína de proliferação p16 (LYDIATT et al., 2017).

Diversos estudos têm demonstrado que, em se tratando de orofaringe, a ausência da proteína p16 exerce importante papel preditor de um pobre prognóstico (LYDIATT et al., 2017). A proteína p16 é uma importante moduladora negativa do ciclo celular, participando por meio do bloqueio da ciclina D1 inativando parcialmente a fosforilação da pRb (proteína do retinoblastoma), que faz com que a célula entre em atividade de mitose. Além de ser um importante preditor da infecção pelo HPV em orofaringe e de ter pouca importância como marcador de prognóstico no câncer intraoral (LEEMANS, 2018), sua identificação por técnicas de imuno-histoquímica está associada a uma sobrevida cinco vezes maior, independente da presença ou não do HPV (LYDIATT et al., 2017).

Alterações afetando proteínas de controle do ciclo celular e enzimas de correção de falhas no material genético têm sido estudadas e relacionadas com o prognóstico de uma série de tumores apresentando uma importante perspectiva (LEEMANS, 2018; FONSECA et al., 2019). No entanto, estudos relacionados ao prognóstico e carcinogênese dos cânceres de boca e orofaringe são ainda inconclusivos.

1.3 Receptores Opioides e Progressão Tumoral

A nomenclatura dos derivados do ópio tem sido alterada com o decorrer dos anos. Já foram denominados narcóticos, hipnoanalgésicos e narcoanalgésicos, termos considerados impróprios por incluírem outras substâncias que provocam o sono (GOZZANI, 1994). Também já foram denominados opiáceos, de início uma designação genérica e depois restrita aos derivados naturais do ópio, como morfina, codeína e tebaína (GOZZANI, 1994). O termo opioide foi proposto para designar as drogas com ação semelhante à morfina, porém com estrutura química diferente. Contudo, o conceito evoluiu e passou a incluir todas as substâncias naturais, semissintéticas ou sintéticas que reagem com os receptores opioides quer como agonistas quer como antagonistas (MARTIN, 1983).

Os opioides agem em pelo menos seis tipos de receptores específicos, os quais exercem suas funções tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico. O subtipo 1 do receptor Mu (μ) (RMO) é responsável pelos sintomas da analgesia, euforia e depressão respiratória, enquanto o subtipo 2 medeia efeitos gastrintestinais; o receptor Kappa (κ) (RKO) relaciona-se a analgesia, sedação, miose, disforia e sintomas psicotomínéticos, como despersonalização e desrealização; o Delta (ζ) interfere na analgesia e pode estar associado a mudanças do humor; o Epsilon (ϵ) associa-se a sedação; o Sigma (δ) está associado a mudanças do humor e, talvez, alucinações; e a Nociceptina/Orfanina FQ (N/OFQ) está relacionada à sensação de medo, dor e ao aprendizado (BENNETT et al., 2019).

A ação das substâncias com propriedade analgésica opioide (peptídeos opioides endógenos e analgésicos opioides) resulta de duas ações inibitórias sobre o sistema nociceptivo desencadeadas pela interação com os receptores opioides: 1) inibição pós-sináptica através do aumento da condutância ao K^+ , promovendo a hiperpolarização neuronal; e 2) inibição da liberação de neurotransmissores relacionados às vias nociceptivas (principalmente glutamato e substância P) (JANAHA et al., 2018).

Os opioides são os medicamentos mais eficazes atualmente disponíveis para o controle da dor oncológica (BENNETT et al., 2019). Nos Estados Unidos, de 30 a 40% dos doentes com câncer recentemente diagnosticados e 90% dos pacientes com câncer

avanzado relatam dor moderada e severa, que progride em relação ao tamanho do tumor, grau de metástases, tipo de tumor e sua localização (KOODIE et al., 2010).

Enquanto a farmacologia e a função dos opioides no sistema nervoso central são bem descritas e estabelecidas, pouco se sabe sobre os seus efeitos nas células tumorais. Por esse motivo, o interesse em investigar as possíveis ações dos opioides, especialmente da morfina, na progressão tumoral tem aumentado na última década (LENNON et al., 2014).

O uso crônico de grandes concentrações de morfina tem sido associado à inibição do crescimento de tumores em alguns trabalhos descritos na literatura (YEAGER & COLACCHIO 1991; TEGEDER et al. 2003; KOODIE et al, 2010; LENNON et al., 2014; PLEIN et al., 2018). Por outro lado, estudos experimentais e análises clínicas retrospectivas sugerem que os opioides podem promover a progressão do câncer, reduzindo a sobrevivência dos pacientes por meio de mecanismos diversos (ZAGON et al, 1983; GUPTA et al. 2002; CHEN et al, 2006; SINGLETON et al, 2006; FAROOQUI et al, 2006; BEUKEN-VAN EVERDINGEN et al.2007; FAROOQUI et al, 2007; APOLONE et al, 2009; BARBERA et al, 2011; FUJIOTA et al. 2011; MATHEW et al, 2011; LENNON et al, 2012; NGUYEN et al, 2014; ZYLLA et al, 2013; SINGLETON et al, 2015). Alguns estudos em modelos animais demonstram que esse efeito estimulatório dos opioides na progressão do câncer envolve a ativação dos receptores opioides (MOSS & ROSOW 2008; WANG et al. 2009; SINGLETON & MOSS 2010; ZHANG et al., 2020), resultando em: 1) na estimulação da via MAPK/Erk e consequente progressão do ciclo celular (GUPTA et al, 2002); 2) na ativação da via PI3K/Akt, mediando efeitos antiapoptóticos (IGLESIAS et al, 2003), sendo essas duas as principais vias de ativação associadas a esses receptores (SUZUKI et al., 2012); 3) no aumento da liberação do fator ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), promovendo a degradação da matriz extracelular e facilitando metástases (GACH et al 2011); e 4) na ativação dos receptores fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), resultando na formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, processo denominado angiogênese através de aumento de COX-2 (SINGLETON & MOSS 2010; LENNON et al., 2012), assim como influenciando a persistência do processo inflamatório, ativando vias de sinalizações comuns às vias inflamatórias (AFSHARIMANI, 2011).

Tem-se mostrado, na literatura, resultados conflitantes sobre a relação da morfina com o processo de progressão tumoral, porém estudos observam que esse

fármaco influencia a resposta inflamatória presente no microambiente tumoral por interagir nas vias de sinalização comuns tanto por meio de respostas anti-inflamatórias como pró-inflamatórias (PLEIN et al., 2018). Tem-se sugerido que os RMOs e RKOs mostram papéis opostos: o primeiro, relacionado com uma indução de atividade pró-inflamatória e pró-angiogênica; e o segundo, anti-inflamatória e antiangiogênica. (SINGLETON et al., 2015; FINLEY, et al., 2008).

Por exemplo, observa-se que a morfina inibe a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bloqueia a ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), além de agir de maneira imunossupressora, inibindo componentes da imunidade celular e humoral como produção de anticorpos, atividade de células Natural Killer (NK) e expressão de inúmeras citocinas (AFSHARIMANI, 2011). Por outro lado, observa-se que uma das vias utilizadas por esse fármaco para estimular o processo de angiogênese seria por meio da ativação da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), mediador importante no processo pró-inflamatório, e que o processo inflamatório aumenta a expressão de receptores opioides através de TNF- α e interleucina-6 (KASAI et al., 2011; GACH, et al., 2011).

1.4 Receptores Opioides no Carcinoma de Células Escamosas

Desde 1996, há evidências de que os receptores opioides são encontrados para além do sistema nervoso central (BIGLIARD, 1998). A detecção destes na periferia sugere que peptídeos opioides endógenos têm importante papel na regulação de processos fisiológicos (SCHREIBER, 2004). Estudos demonstraram que queratinócitos de epiderme apresentam RMO e RKO, e que eles devem desempenhar um papel específico nessas células em respostas de seus agonistas. Por imuno-histoquímica, nos tecidos epiteliais, observou-se positividade para RMO e RKO em citoplasma e núcleo celular, principalmente em membrana basal e parabasal, perdendo essa expressão nas outras camadas do tecido (BIGLIARD, 1998; SCHREIBER, 2004; KUPCZYK et al., 2017; TANEDA et al., 2011).

Em epitélio oral, também já foram evidenciados todos os principais receptores opioides em linhagens celulares, inclusive demonstrando que, quando células de epitélio oral são incubadas com morfina, há o estímulo de migração destas (CHARBAJI, 2012). Já em células tumorais, RKO e RMO têm sido expressos em tumores

de próstata, mama, hepático e no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (FUJIOKA., et al., 2011; SINGLETON et al., 2014, ZHANG et al., 2013).

No carcinoma de células escamosas, Zhang et al., 2013 e 2015, foram os primeiros estudiosos a demonstrar positividade membranar, citoplasmática e nuclear de RMO e RKO tanto em tecidos displásicos como em tumores de esôfago. Além disso, mostraram a influência desses receptores na sobrevida dos pacientes.

Zhang et al., em 2013, estudaram a imunexpressão de RKO em linhagens celulares de tumor de esôfago, tecido displásico e em tecido tumoral parafinado. Observaram que RKO é expresso nas linhagens celulares estudadas e é suprarregulado em displasia de alto grau e no carcinoma. O epitélio displásico exibiu coloração fraca, enquanto coloração moderada ou forte foi encontrada em espécimes de múltiplos estágios de progressão tumoral. A proteína RKO estava localizada não apenas na membrana celular, mas também no núcleo, no citoplasma ou em ambos. Foi observada uma associação significativa entre a alta expressão de RKO nuclear e metástases em linfonodos. Os pacientes com CCE de esôfago com alta expressão de RKO nuclear tiveram um prognóstico significativamente e sobrevida pior do que aqueles com baixa expressão. Ainda assim, os autores especularam que o RKO nuclear participa da transdução de sinal intrácrino e regula a transcrição gênica relacionada ao crescimento e metástase de CCE de esôfago.

Já Zhang et al., em 2015, estudaram a expressão de RMO em CCE de esôfago. Seus resultados mostraram que RMO exibiu quatro fenótipos de imunocoloração distintos: coloração negativa ou fraca, coloração citoplasmática, coloração nuclear e coloração membranar. Uma análise mais aprofundada da expressão de RMO no núcleo e na membrana mostrou que apenas nove e 10 tinham expressão moderada de RMO, respectivamente. Não foram observados casos com coloração intensa de RMO no núcleo ou na membrana. Uma associação significativa entre a expressão de RMO no citoplasma e metástases em linfonodos foi encontrada nesse estudo. Especulando que essa estreita associação entre o nível de expressão citoplasmática de RMO e metástases em linfonodos sugere que esse receptor possa estar envolvido na progressão do CCE. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a expressão de RMO no citoplasma e a sobrevida global, indicando que RMO citoplasmático pode ser

um fator de alto risco para metástases em linfonodos, mas não um potencial marcador prognóstico de pacientes com CCE de esôfago.

Em 2020, Zhang et al. estudaram a expressão de RMO em um total de 207 pacientes submetidos à laringectomia para CCE. Os níveis de RMO em tecidos tumorais eram significativamente mais elevados do que aqueles em tecido não tumoral adjacente e foram positivamente correlacionados com o grau histológico, classificação T, estágio clínico e acometimento linfonodal. No entanto, não foram significativamente associados com idade, sexo, consumo de álcool, história de tabagismo, estado físico ASA, procedimento cirúrgico e local do tumor primário.

Esses estudos demonstram que há uma relação importante entre a expressão de receptores opioides e fatores prognósticos nos tumores de cabeça e pescoço. Apesar de serem trabalhos iniciais e retrospectivos, trazem a perspectiva de um campo a ser explorado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a imunexpressão dos receptores opioides em epitélio de mucosa oral, em lesões potencialmente malignas e em carcinomas de células escamosas de boca e de orofaringe, correlacionando com fatores prognósticos, de proliferação e morte celular.

2.2. Objetivos Específicos

Caracterizar a imunexpressão dos RMO e RKO em mucosa oral e em lesões LPM de cavidade oral.

Determinar, em carcinomas de células escamosas de boca e de orofaringe, a imunexpressão dos RMO e RKO.

Determinar, em tecido perilesional de carcinomas de células escamosas de orofaringe, a imunexpressão de RMO, RKO, Caspase -3 e Ki67.

Determinar, em metástases linfonodais de carcinomas de células escamosas de orofaringe, a imunexpressão de RMO e RKO.

Correlacionar a imunexpressão dos receptores opioides com Ki 67 em carcinomas de boca.

Associar os dados coletados nas análises imuno-histoquímicas com fatores prognósticos, incluindo estadiamento tumoral e sobrevida global.

3. CAPÍTULOS

REGIMENTO INTERNO

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para teses de doutorado, permitindo a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. O projeto de pesquisa referente ao trabalho desenvolvido foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará e do Hospital Haroldo Juaçaba, tendo sido aprovado (ANEXO 1 e 2) e conduzido de acordo com a declaração de Helsinki. Desse modo, a presente tese de doutorado é composta pelos seguintes capítulos:

- **Capítulo 1: Receptores opioides Mu (μ) e Kappa (κ) desempenham um papel na sobrevida global no carcinoma de células escamosas oral: um estudo retrospectivo e imuno-histoquímico.** Este trabalho será submetido à publicação na revista “Oral Disease” (ISSN 1354-523X; Qualis CAPES A1; fator de impacto 2,613) (ANEXO 3).
- **Capítulo 2: A imunoexpressão de receptores Mu e Kappa opioides como fatores de prognóstico do carcinoma de células escamosas da orofaringe: um estudo observacional transversal.** Este trabalho será submetido à publicação na revista “Oral Disease” (ISSN 1354-523X; Qualis CAPES A1; fator de impacto 2,613) (ANEXO 3).

3.1. Capítulo 1

Receptores opioides Mu (u) e Kappa (k) desempenham um papel na sobrevida global no carcinoma de células escamosas oral: um estudo retrospectivo e imuno-histoquímico.

Thinali Sousa Dantas^{1,2}

Paulo Goberlânio de Barros Silva^{1,2,4}

Ana Paula Negreiros Nunes Alves¹

Maria do Perpétuo Socorro Saldanha Cunha⁴

Mário Rogério Lima Mota²

Renata Ferreira de Carvalho Leitão³

Fabrcio Bitu Sousa^{1,2,4}

¹Laboratório de Patologia Bucal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Departamento de Odontologia, Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

⁴ Instituto do Câncer do Ceará, Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Autor de Correspondência:

Paulo Goberlânio de Barros Silva

Curso de Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Rua João Adolfo Gurgel, número 133, 60190-060, Fortaleza, Ceará, Brasil; Telefone 1 / Fax: +55 85 32658100. E-mail: paulo_goberlanio@yahoo.com.br

Resumo:

Objetivo: Caracterizar a imunexpressão de receptores opioides em epitélio de mucosa oral, displasia e carcinoma e avaliar sua influência no prognóstico desses tumores. Metodologia: Estudo observacional, retrospectivo e transversal em que foram avaliadas 25 amostras de epitélio de mucosa oral, 25 amostras de lesões potencialmente malignas (LPM) e 50 amostras de carcinoma de células escamosas (CCE) por meio de imunohistoquímica para receptores Mu opioide (RMO), Kappa opioide (RKO) e Ki67. Foi avaliado o percentual de células epiteliais exibindo imunomarcção para os dois receptores, e dados clínico-patológicos e prognósticos foram associados por meio dos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Log-Rank Mantel-Cox e regressão de Cox. **Resultados:** Houve aumento da imunexpressão de ambos os receptores e do Ki67 em LPM e CCE em comparação com epitélio de mucosa oral. Características clínicas como sexo, idade, histórico de fumo, etilismo e localização do tumor primário não influenciaram na imunexpressão para os receptores opioides, porém uma menor expressão de RMO foi observada em tumores T1, e RKO em citoplasma foi associado a uma menor sobrevida global dos pacientes. **Conclusão:** Há um aumento de receptores opioides em CCE, o RMO está diretamente associado ao Ki67, onde menores tumores apresentam menor expressão deste receptor e o RKO influencia diretamente na sobrevida de pacientes.

Introdução

O carcinoma de células escamosas (CCE) da boca é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio de revestimento (Yap T et. al., 2020), sendo o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, com incidência de mais de 600.000 casos novos por ano (HU et al., 2020). Na região de cabeça e pescoço, a língua é a estrutura com maior ocorrência desses cânceres, com 32% dos casos, seguidos da orofaringe (18,5%) e do assoalho de boca (12,4%) (Melo LC, Silva MC, Bernardo JMP, Marques EB & Leite ICG, 2010).

Fatores de risco relacionados ao câncer oral envolvem a exposição crônica a agentes físicos e químicos, levando a instabilidade genética nas células epiteliais, com desenvolvimento de lesões potencialmente malignas e, posteriormente, ao carcinoma invasivo (Jadotte YT & Schwartz RA, 2012).

Os carcinomas orais apresentam sobrevida de 30 a 65%, em cinco anos, em países em desenvolvimento, sendo diagnosticados de maneira tardia, quando os pacientes procuram o serviço com tumores maiores, muitas vezes tendo que lidar com dor, tratamentos mutilantes e baixa qualidade de vida (Dantas et al., 2016).

Os opioides são o principal grupo de agentes farmacológicos utilizados durante a anestesia geral, apresentando um componente sedativo e analgésico, através de ligação a receptores opioides. Essas substâncias também podem causar um efeito imunossupressor podendo interferir no prognóstico geral do paciente oncológico (Janah, A. et al., 2018; Bennett, M. I. et al., 2019). Os opioides são considerados medicações eficientes contra a dor crônica relacionada ao câncer ou dor pós-operatória, entretanto, pode apresentar como efeitos adversos o desenvolvimento de tolerância, dependência, diminuição da motilidade gastrointestinal e depressão respiratória, tendo seus efeitos associados a ativação de receptores opioides (Colvin, L. A., Bull, F., & Hales, T. G., 2019).

Esses medicamentos se ligam a receptores opioides, que são proteínas integrais de membrana, acopladas a proteínas G, e sua estrutura consiste em sete domínios transmembranares hidrofóbicos TM I-VII, três intracelulares hidrofóbicos (i1-i3) e três alças extracelulares (e1-e3), um amino glicosilado e um terminal carboxila. Esses receptores podem ser classificados nos seguintes grupos: receptores clássicos sensíveis à naloxona: receptor μ Opioide (RMO), receptor δ Opioide (RDO) e receptor κ Opioide (RKO); e receptores não clássicos insensíveis à naloxona (RNOs). Os receptores opioides são comumente encontrados no sistema nervoso central e periférico (Kosciuczuk, U., Knapp, P., & Lotowska-Cwiklewska, A. M., 2020), mas a expressão desses receptores em células neoplásicas (câncer de mama, carcinoma de células pequenas no pulmão e carcinoma hepatocelular) sugere uma possível influência no estabelecimento e progressão do câncer (Lennon, F. E., et al., 2014; Plein, L. M., & Rittner, H. L., 2018).

Os receptores opioides podem regular a transcrição de fatores de crescimento, promover formação capilar e neovascularização do tecido neoplásico, bem como proliferação e migração de células tumorais (Lennon, F. E., et al., 2014) e metastatização (Zhang, Y. F. et al., 2015). Na literatura, há resultados conflitantes sobre a ativação de receptores opioides e a progressão tumoral, porém tem sido sugerido que esse fármaco influencia a resposta inflamatória presente no microambiente tumoral por interagir nas

vias de sinalização comuns (Finley, M. J., Happel, C. M., Kaminsky, D. E., & Rogers, T. J., 2008; Singleton, P. A., Moss, J., Karp, D. D., Atkins, J. T., & Janku, F., 2015). Um achado interessante é que pacientes que limitaram o uso de morfina tiveram um risco reduzido de recorrência do tumor, sugerindo que esses fármacos participam ativamente no prognóstico de pacientes oncológicos (Plein, L. M., & Rittner, H. L., 2018).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a imunexpressão dos RMO e RKO em tecido epitelial de mucosa oral, displasia e carcinoma e a sua influência na sobrevida e prognóstico dos pacientes com CCE oral.

Materiais e Métodos

Delineamento amostral e desenho do estudo

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa de seres humanos da Universidade Federal do Ceará e do Hospital Haroldo Juaçaba, aceito com número de parecer 3.212.746 e 1.552.674, respectivamente, caracterizando-se como um estudo observacional, quantitativo, de caráter retrospectivo e de corte transversal.

Baseado no estudo de ZHANG et al., 2015, que observou que amostras de CCE de esôfago apresentavam maior frequência de positividade para o RKO que amostras de tecido sadio (85% versus 35%), estimou-se que seriam necessários 25 pacientes com LPM e 50 com CCE a fim de se obter uma amostra que representasse 90% de poder e 95% de confiança para a hipótese alternativa deste trabalho (método de Fleiss com correção de continuidade), adotando uma razão de casos: controle 1:2.

Foram selecionados 25 blocos parafinados com amostras de biópsias incisórias de mucosa oral de pacientes sem carcinoma de células escamosas ou outra alteração em cavidade oral, 25 amostras de LPM oriundas do Laboratório de Patologia BucL da Universidade Federal do Ceará e 50 amostras de biópsias excisionais de carcinoma de células escamosas oriundas do Hospital Haroldo Juaçaba.

Após seleção da amostra, foram levantados também os laudos histopatológicos e lâminas histológicas dos referidos serviços para avaliação do grau de displasia e gradação tumoral, já previamente classificado pela patologista responsável pelos laboratórios. Essa gradação é determinada de acordo com a OMS (2017) em: displasias leves, moderadas e severas; e em relação aos tumores CCE, em: bem diferenciado, moderadamente

diferenciado ou pobremente diferenciado.

Além das lâminas e dos blocos parafinados, foram avaliados os prontuários dos pacientes com carcinoma de células escamosas para obtenção de dados sociodemográficos, como idade, sexo, histórico de uso de fumo e álcool, além de dados clínico-patológicos, como localização primária, TNM e estadiamento tumoral e tratamento realizado.

Também foi coletada a taxa de sobrevivência (em meses), obtida através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) e a data do óbito ou data do último registro de seguimento (dia, mês e ano) utilizando, para fins de análise estatística, a quantidade de semanas entre essas datas, assim como descrito por Dantas et al. (2016).

Após a seleção da amostra, foram avaliadas as lâminas histológicas das biópsias incisionais e excisionais, e foram levantados os respectivos blocos para realização de confecção de blocos de *Tissue Microarray* e reação de imuno-histoquímica. Foram excluídos os blocos com qualidade ou material considerados insuficientes pelos patologistas.

Confecção de blocos de Tissue Microarray e Reação de imuno-histoquímica

Para as amostras de LPM, foram realizados cortes histológicos convencionais e depositados em lâminas de vidro para coloração de hematoxilina-eosina e lâminas silanizadas para imuno-histoquímica.

Para amostras de carcinomas, após a seleção dos pacientes, a patologista do hospital foi orientada a marcar, nas lâminas histológicas, áreas que representassem: na peça cirúrgica, com perênquima tumoral adequado, assim como feito por Liu et al. (2016). Após a seleção e marcação das lâminas, seus respectivos blocos (bloco doador) foram levantados para a confecção do bloco de TMA (bloco receptor).

Para a técnica de TMA, um dispositivo técnico chamado “*tissue microarrayer*” (Quick-Ray UNITMA®) foi utilizado. Com esse dispositivo, punciona-se um fragmento de tecido com 2 mm de diâmetro, com maior representatividade do bloco doador e transfere-se, de maneira ordenada, para o bloco receptor.

Em uma mesma sessão, o bloco receptor foi, então, submetido a cortes sequenciais de 3 µm de espessura, que foram depositados em lâminas de vidro silanizadas

para realização de coloração convencional por hematoxilina-eosina e para reações de imuno-histoquímica.

A reação de imuno-histoquímica ocorreu através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização e reidratação, foi realizada recuperação antigênica por meio de sistema em banho maria a 97°C durante 45 minutos em solução de citrato em pH6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%, lavagem com solução tampão de fosfato (PBS) e incubação *overnight* com os anticorpos primários antirreceptor Mu opioide (1:100, clone UMB3, Abcam®) e antirreceptor Kappa opioide (1:750, clone ab138734, Abcam®) e Ki67 (MIB-1, Dako®).

Após incubação com o anticorpo primário por tempo determinado pelo fabricante, as lâminas foram lavadas (PBS) e incubadas com anticorpo secundário biotilado por 30 minutos e, após lavagem, incubadas com conjugado de peroxidase avidina-biotina ou sistema Dako® por 30 minutos. Secções histológicas de cérebro humano foram usadas como controle positivo, nas quais a supressão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo.

Análise Imuno-histoquímica

A análise da imunomarcagem foi realizada a partir da fotografia de cinco campos aleatórios por corte histológico em um aumento de 400x por meio de um microscópio com câmera acoplada (Leica DM 2000®). As imagens foram exportadas para o software ImageJ®, e utilizado o comando *cell conter*.

Para as amostras de epitélio de mucosa oral sem alterações, foram contadas células marcadas e não marcadas e determinada a porcentagem; nas LPMs, foi feita uma individualização da área de displasia, com limitação em quais camadas do epitélio havia presença de alterações, sendo procedida análise em displasias leves nas camadas basal e parabasal; em displasia moderada, até a camada média; e em displasias severas, foi quantificada toda a extensão do epitélio. Após isso, foram contadas as células marcadas e não marcadas para os anticorpos avaliados, finalizando com a porcentagem de marcação.

Nos carcinomas, foi determinada a porcentagem de células tumorais marcadas e não marcadas em áreas representativas de parênquima tumoral.

Em todas as amostras, foi também considerada a localização celular dessa marcação, se em citoplasma, núcleo ou membrana. (Zhang et al., 2015). Para avaliação quantitativa de Ki67, as células eram consideradas positivas quando havia coloração amarronzada em núcleo celular.

Análise estatística

Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual, e os dados referentes às contagens em forma de média e desvio-padrão, submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados por meio dos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis/Dunn e correlação de Spearman. Adicionalmente, curvas de Kaplan-Meier foram criadas para os marcadores que mostraram associação significativa e foram comparadas pelo teste de Log-Rank Mantel-Cox. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20,0 para Windows.

Resultados

A amostra deste estudo foi composta por 16 LPMs com displasia leve, 6 LPMs com displasia moderada e três com displasia severa. Em relação aos pacientes com CCE de boca, a maioria dos pacientes era do sexo masculino (n=35), com idade até 60 anos (n=36), sem histórico de fumo (n=36) e álcool (n=37). A língua foi a localização primária do tumor de maior prevalência (n=26), tumores moderadamente diferenciados (n=45), estadiamento T2 (n=18), sem acometimento linfonodal (n=30), com estágio II (19). A modalidade de tratamento mais utilizada foi a cirurgia combinada com a radioterapia (n=21), e 10 pacientes da amostra vieram a óbito.

Todas as amostras de epitélio normal não apresentaram imunexpressão membranar para RMO, apenas dois casos de displasia mostraram alguma expressão desse receptor em membrana, e nenhum caso de CCE apresentou imunexpressão membranar (p=0,124). Não houve diferença significativa entre os três grupos. Em citoplasma, houve aumento significativo de RMO na displasia e novo aumento no CCE (p<0,001) (Tabela 1) (Figura 1).

Apenas dois casos de epitélio normal e de displasia apresentaram imunexpressão membranar para RKO, e nenhum caso de CCE apresentou imunexpressão membranar para RKO (Tabela 1) (Figura 1).

Por sua vez, a imunexpressão para Ki67 aumentou significativamente do tecido normal para a displasia e para o CCE ($p < 0,001$) (Tabela 1) (Figura 1).

Não houve influência significativa entre os graus de displasia na imunexpressão para os receptores opioides (Tabela 2). E no CCE as características clínicas como sexo, idade, histórico de fumo, etilismo e localização do tumor primário também não influenciaram na imunexpressão para os receptores opioides (Tabela 3).

Apesar de a gradação histológica do CCE não influenciar na imunexpressão para os receptores opioides, os tumores T1 apresentaram menor imunexpressão citoplasmática de RMO que os demais estádios T ($p < 0,001$). Consequentemente, o estádio clínico 1 mostrou menor imunexpressão citoplasmática de RMO que os demais estádios T ($p = 0,019$). O acometimento nodal e o tipo de tratamento realizado não se associaram a diferentes imunexpressões para os receptores opioides, porém os pacientes que foram a óbito apresentaram maior imunexpressão para RKO em citoplasma ($p = 0,041$) (Tabela 4).

Quando estratificados em abaixo e acima de 95%, o tempo médio de sobrevida global dos pacientes com baixa expressão citoplasmática para RKO ($56,6 \pm 3,2$ meses, 100,0%) foi significativamente superior aos pacientes com alta expressão citoplasmática para RKO ($40,7 \pm 3,7$ meses, 79,2%) (Figura 2).

No tecido-controle e nas displasias, a imunexpressão de Ki67 não mostrou correlação significativa com RKO e RMO, porém, em CCE, a marcação citoplasmática para RMO foi diretamente correlacionada com a imunexpressão para Ki67 ($p = 0,019$) (Tabela 5).

Discussão

Este estudo evidenciou a imunexpressão de receptores opioides em diferentes localizações celulares em epitélio de mucosa oral, displasia e CCE de boca, além de demonstrar a relação desses receptores com fatores de prognóstico.

Os fármacos opioides são amplamente utilizados para analgesia durante a anestesia geral e tratamento de dor crônica associada à recuperação pós-operatória e dores oncológicas. Diversos estudos (Zhang, Y. F., et al., 2015; Zhang, Y. F., et al., 2013; Szczepaniak, A., Fichna, J., & Zielińska, M., 2020; Carli, M., Donnini, S., Pellegrini, C., Coppi, E., & Bocci, G., 2020) já evidenciam a presença desses receptores em células cancerosas, sendo sugerida uma possível influência dos efeitos dos seus agonistas e antagonistas na progressão tumoral, metástases, angiogênese e imunossupressão. Entretanto, esses efeitos ainda são controversos na literatura, visto que já foram observados diversos comportamentos a depender do tipo de receptor e câncer a ser estudado. O CCE de boca é caracterizado pelo seu caráter agressivo, com comportamento biológico imprevisível e prognóstico desfavorável (McDermott, J. D., et al. 2019; Chai, A., Lim, K. P., & Cheong, S. C., 2020). Apesar da alta prevalência desse câncer na população mundial (Bugshan, A., & Farooq, I., 2020; Machiels, J. P., et al., 2020), é inédito, na literatura, um estudo que avalie o comportamento da imunexpressão de receptores opioides na displasia e em CCE de boca e a influência desses receptores na sobrevida e prognóstico dos pacientes

A presença dos principais receptores opioides (RMO, RKO e RDO) nas células que compõem o epitélio oral já tem sido descrita (Charbaji, N., Schäfer-Korting, M., & Kùchler, S., 2012) e, na amostra deste estudo, foi encontrada uma maior expressão de RMO nos casos de CCE e displasia, e a imunexpressão de RMO nuclear e citoplasmático apresentou diferenças estatísticas em displasia e CCE. Diferente dos achados deste estudo, um estudo retrospectivo realizado por Zylla, D., et al., 2013, em pacientes com câncer de próstata, evidenciou que a expressão de RMO foi mais encontrada na membrana celular do que em núcleo. Zhang YF et al., 2015 relataram que, em sua amostra de CCE de esôfago, os receptores RMO estavam localizados principalmente no citoplasma e pontualmente em membrana ou núcleo das células, com apenas 3,8% em região de núcleo. E um estudo retrospectivo realizado com CCE de laringe mostrou que a expressão de RMO foi significativamente maior no tecido tumoral quando comparado ao não tumoral adjacente (Zhang, H. et al., 2020).

Chen D. et al. 2017 observaram aumento na expressão de RKO nuclear em sua amostra de CCE de esôfago, e Zhang Y. F. et al., 2013 encontraram expressão de RKO em diversas linhagens de células do CCE de esôfago, em membrana celular, núcleo e

citoplasma, relatando, ainda, uma maior expressão nas displasias de alto grau e de CCE, o que corrobora com os presentes resultados, nos quais os receptores opioides foram mais expressos em CCE de boca quando comparados com displasias e epitélio sem alterações, sem influencia das diferentes gradações de displasia nessa imunexpressão.

Em relação aos aspectos clínico-patológicos e de fatores prognósticos, um estudo de coorte realizado em pacientes com carcinoma hepatocelular mostrou que a baixa expressão de RKO está correlacionada significativamente com características clínico-patológicas mais agressivas, estágios TNM mais avançados, tamanho do tumor, invasão vascular e pouca diferenciação, sendo sugerido que o RKO poderia se tornar um potencial supressor tumoral (Chen D. et al. 2017). No entanto, Zhang, H. et al., 2020, estudando tumores de laringe, encontraram uma correlação positiva dessa expressão com o grau histológico, estágio clínico, acometimento linfonodal e tamanho do tumor, sugerindo um papel similar ao descrito no nosso estudo nos tumores de cabeça e pescoço. No presente trabalho, não foi observada uma associação entre os aspectos clínicos e a imunexpressão de RKO, porém a sobrevida global dos pacientes descritos foi influenciada negativamente pela maior imunexpressão citoplasmática de RKO.

Na literatura, a maior expressão de receptores opioides, principalmente RMO, está associada a um pior prognóstico e maior progressão tumoral em pacientes com carcinoma de células pequenas em pulmão e câncer de próstata (Singleton, P. A., Mirzapioazova, T., Hasina, R., Salgia, R., & Moss, J. 2014; Fujioka, N. et al., 2011). O RMO causa imunossupressão por interações diretas e/ou indiretas desses fármacos com os receptores localizados nas células tumorais (Singleton, P. A. et al., 2014; Fujioka, N. et al., 2011), impactando diretamente no prognóstico de tumores como o de esôfago aumentando o risco para desenvolvimento de metástases nodais (Zhang, Y. F. et al., 2015). A marcação citoplasmática de RMO também foi diretamente correlacionada com a imunexpressão de Ki67, podendo demonstrar um papel desse receptor na proliferação celular (Aaltomaa, S. et al., 2006; Yang, X. Q. et al., 2011; Lopes, V. et al., 2017).

A imunexpressão de RKO também esteve aumentada na displasia em região de núcleo e citoplasma, sugerindo a maior presença de translocações relacionadas ao metabolismo de reciclagem dos receptores. Chong (2012) descreve que o fenômeno da internalização de receptores como evento comum a todos os receptores acoplados à

proteína G e a internalização pode tanto estar envolvido na redução da atividade quanto no restabelecimento dela, uma vez que a endocitose do receptor dessensibilizado é necessária para a desfosforilação e subsequente ressensibilização. Esses achados contraditórios reiteram que a expressão dos receptores opioides apresenta comportamentos heterogêneos a depender da localização celular e do tipo de neoplasia maligna a ser estudada, dificultando a correta interpretação das suas influências na carcinogênese e progressão tumoral.

As vias pelas quais a ativação de receptores opioides podem atuar na progressão tumoral ainda precisam ser elucidadas, mas a literatura traz evidências de que sua ativação estimula PI3K/AKT, uma via de sinalização importante inclusive no CCE de boca (ZAMBELI, 2011). Outro efeito estudado dentro da progressão tumoral é a estimulação da produção de VEGF através da ativação de receptores opioides.

Apesar de não haver uma relação direta do VEGF e dos receptores opioides, estudos mostram que a ativação desses receptores em tecidos lesionados faz com que haja um aumento da expressão de VEGF favorecendo a angiogênese (SINGLETON & MOSS 2010; LENNON et al., 2012). Há ainda um contrassenso sobre a via relacionada com o aumento ou diminuição de VEGF e ativação de receptores opioides. Alguns relacionam a ativação de mu-opioides com aumento de VEGF, e outros Kappa opioide com a diminuição (KOHEI YAMAMIZU, 2014). Porém o que se sabe é que a angiogênese favorece proliferação celular e conseqüente crescimento tumoral.

Talvez as limitações desta pesquisa sejam: 1) estudo com *design* retrospectivo; 2) impossibilidade de determinar a velocidade de crescimento celular, apesar de ser evidenciada associação com o tamanho do tumor; 3) não foi possível determinar o que está levando a essa imunexpressão aumentada, parênquima tumoral, próprio tumor ou feedback positivo celular. Todavia, este estudo demonstra, de forma inédita, o comportamento desses receptores nos tecidos pré-neoplásicos e neoplásicos de CCE de boca. Os resultados revelam que RMO e RKO estão diretamente associados a maior proliferação celular, estadiamento tumoral e, conseqüentemente, pior prognóstico, e o RKO ainda esteve fortemente associado à sobrevida global dos pacientes.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará e ao Hospital Haroldo Juaçaba, pois, sem estes, certamente não seria possível a realização desta Pesquisa.

Referências

1. Aaltomaa, S., Kärjä, V., Lipponen, P., Isotalo, T., Kankkunen, J. P., Talja, M., & Mokka, R. (2006). Expression of Ki67, cyclin D1 and apoptosis markers correlated with survival in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Anticancer research*, 26(6C), 4873–4878.
2. Almangush, A., Heikkinen, I., Mäkitie, A. A., Coletta, R. D., Läärä, E., Leivo, I., & Salo, T. (2017). Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer*, 117(6), 856–866. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.244>
3. Bennett, M. I., Eisenberg, E., Ahmedzai, S. H., Bhaskar, A., O'Brien, T., Mercadante, S., Krčevski Škvarč, N., Vissers, K., Wirz, S., Wells, C., & Morlion, B. (2019). Standards for the management of cancer-related pain across Europe-A position paper from the EFIC Task Force on Cancer Pain. *European journal of pain (London, England)*, 23(4), 660–668. <https://doi.org/10.1002/ejp.1346>
4. Birla, R., Ganda, C., Hoara, P., Caragui, A., Marica, C., Vasiliu, E., & Constantinoiu, S. (2018). Clinical and Therapeutic Implications of the 8th Edition TNM Classification of Adenocarcinomas of the Esophagogastric Junction. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*, 113(6), 747–757. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.113.6.747>
5. Bugshan, A., & Farooq, I. (2020). Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. *F1000Research*, 9, 229. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22941.1>
6. Carli, M., Donnini, S., Pellegrini, C., Coppi, E., & Bocci, G. (2020). Opioid receptors beyond pain control: The role in cancer pathology and the debated importance of their pharmacological modulation. *Pharmacological research*, 159, 104938. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104938>

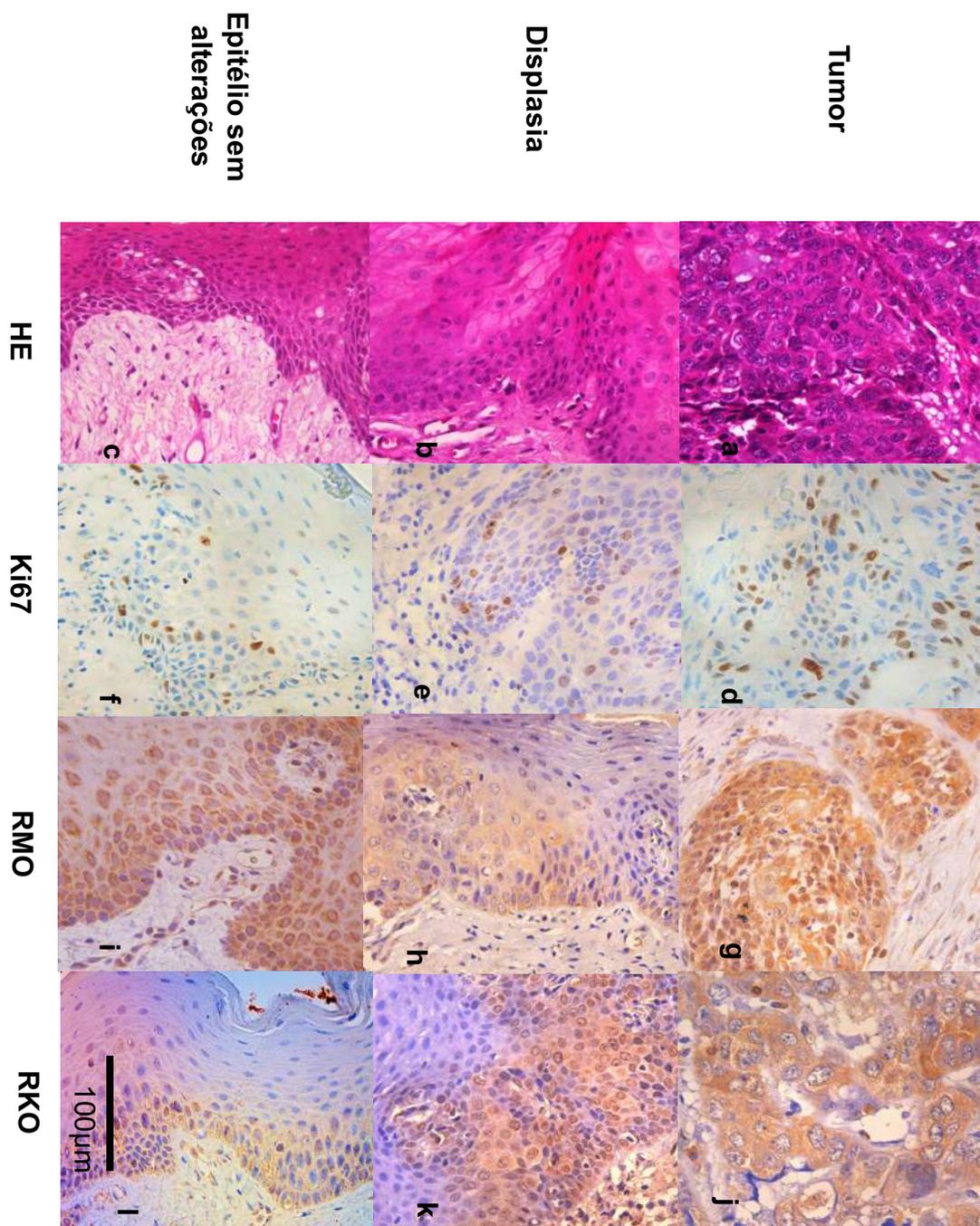
7. Chai, A., Lim, K. P., & Cheong, S. C. (2020). Translational genomics and recent advances in oral squamous cell carcinoma. *Seminars in cancer biology*, *61*, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.011>
8. Charbaji, N., Schäfer-Korting, M., & Küchler, S. (2012). Morphine stimulates cell migration of oral epithelial cells by delta-opioid receptor activation. *PloS one*, *7*(8), e42616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042616>
9. Chen, D., Chen, Y., Yan, Y., Pan, J., Xing, W., Li, Q., & Zeng, W. (2017). Down-regulation of the tumour suppressor κ -opioid receptor predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *BMC cancer*, *17*(1), 553. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3541-9>
10. Colvin, L. A., Bull, F., & Hales, T. G. (2019). Perioperative opioid analgesia-when is enough too much? A review of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Lancet (London, England)*, *393*(10180), 1558–1568. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30430-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30430-1)
11. Dantas, T. S., de Barros Silva, P. G., Sousa, E. F., da Cunha, M., de Aguiar, A., Costa, F., Mota, M., Alves, A., & Sousa, F. B. (2016). Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. *Medicine*, *95*(3), e2314. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002314>
12. Finley, M. J., Happel, C. M., Kaminsky, D. E., & Rogers, T. J. (2008). Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. *Cellular immunology*, *252*(1-2), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.09.008>
13. Fujioka, N., Nguyen, J., Chen, C., Li, Y., Pasrija, T., Niehans, G., Johnson, K. N., Gupta, V., Kratzke, R. A., & Gupta, K. (2011). Morphine-induced epidermal growth factor pathway activation in non-small cell lung cancer. *Anesthesia and analgesia*, *113*(6), 1353–1364. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e318232b35a>
14. Hu, Z., Yang, R., Li, L., Mao, L., Liu, S., Qiao, S., Ren, G., & Hu, J. (2020). Validation of Gene Profiles for Analysis of Regional Lymphatic Metastases in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in molecular biosciences*, *7*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00003>

15. Huang, S. H., & O'Sullivan, B. (2017). Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Current treatment options in oncology*, 18(7), 40. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0484-y>
16. Jadotte, Y. T., & Schwartz, R. A. (2012). Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(2), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.09.040>
17. Janah, A., Bouhnik, A. D., Cortaredona, S., Mancini, J., Bousquet, P. J., Peretti-Watel, P., & Bendiane, M. K. (2018). Opioid analgesics prescription in people with and without cancer in France. *Journal of opioid management*, 14(4), 245–256. <https://doi.org/10.5055/jom.2018.0456>
18. Kosciuczuk, U., Knapp, P., & Lotowska-Cwiklewska, A. M. (2020). Opioid-induced immunosuppression and carcinogenesis promotion theories create the newest trend in acute and chronic pain pharmacotherapy. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 75, e1554. <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1554>
19. Lennon, F. E., Mirzapioazova, T., Mambetsariev, B., Poroyko, V. A., Salgia, R., Moss, J., & Singleton, P. A. (2014). The Mu opioid receptor promotes opioid and growth factor-induced proliferation, migration and Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in human lung cancer. *PloS one*, 9(3), e91577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091577>
20. Lopes, V., Jesus, A. S., Souza, L. L., Miyahara, L., Guimarães, D. M., Pontes, H., Pontes, F., & Carvalho, P. L. (2017). Ki67 protein predicts survival in oral squamous carcinoma cells: an immunohistochemical study. *Brazilian oral research*, 31, e66. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0066>
21. Machiels, J. P., René Leemans, C., Golusinski, W., Grau, C., Licitra, L., Gregoire, V., EHNS Executive Board. Electronic address: secretariat@ehns.org, ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org, & ESTRO Executive Board. Electronic address: info@estro.org (2020). Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 31(11), 1462–1475. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>
22. McDermott, J. D., Eguchi, M., Stokes, W. A., Amini, A., Hararah, M., Ding, D., Valentine, A., Bradley, C. J., & Karam, S. D. (2019). Short- and Long-term Opioid

- Use in Patients with Oral and Oropharynx Cancer. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 160(3), 409–419. <https://doi.org/10.1177/0194599818808513>
23. Melo LC, Silva MC, Bernardo JMP, Marques EB & Leite ICG (2010). Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. *RGO – Rev. Gaúcha Odontol.* 58(3):351-5.
24. Menon, S. S., Guruvayoorappan, C., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2019). Ki67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 491, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.011>
25. Ondrovics, M., Hoelbl-Kovacic, A., & Fux, D. A. (2017). Opioids: Modulators of angiogenesis in wound healing and cancer. *Oncotarget*, 8(15), 25783–25796. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15419>
26. Perera, F. P., & Weinstein, I. B. (2000). Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3), 517–524. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.517>
27. Plein, L. M., & Rittner, H. L. (2018). Opioids and the immune system - friend or foe. *British journal of pharmacology*, 175(14), 2717–2725. <https://doi.org/10.1111/bph.13750>
28. Singleton, P. A., Mirzapioiazova, T., Hasina, R., Salgia, R., & Moss, J. (2014). Increased μ -opioid receptor expression in metastatic lung cancer. *British journal of anaesthesia*, 113 Suppl 1(Suppl 1), i103–i108. <https://doi.org/10.1093/bja/aeu165>
29. Singleton, P. A., Moss, J., Karp, D. D., Atkins, J. T., & Janku, F. (2015). The mu opioid receptor: A new target for cancer therapy?. *Cancer*, 121(16), 2681–2688. <https://doi.org/10.1002/cncr.29460>
30. Szczepaniak, A., Fichna, J., & Zielińska, M. (2020). Opioids in Cancer Development, Progression and Metastasis: Focus on Colorectal Cancer. *Current treatment options in oncology*, 21(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0699-1>
31. Yang, X. Q., Wang, F. B., Chen, C., Peng, C. W., Zhang, J. F., & Li, Y. (2011). High Ki67 expression is a poor prognostic indicator of 5-year recurrence free survival in patients with invasive breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 12(11), 3101–3105.

32. Yap, T., Pruthi, N., Seers, C., Belobrov, S., McCullough, M., & Celentano, A. (2020). Extracellular Vesicles in Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1197. <https://doi.org/10.3390/ijms21041197>
33. Zhang, H., Sun, M., Zhou, D., Gorur, A., Sun, Z., Zeng, W., Cata, J. P., Chen, W., & Miao, C. (2020). Increased mu-opioid receptor expression is associated with reduced disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *British journal of anaesthesia*, 125(5), 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2020.07.051>
34. Zhang, Y. F., Xu, Q. X., Liao, L. D., Xu, X. E., Wu, J. Y., Shen, J., Wu, Z. Y., Shen, J. H., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2013). κ -Opioid receptor in the nucleus is a novel prognostic factor of esophageal squamous cell carcinoma. *Human pathology*, 44(9), 1756–1765. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.11.025>
35. Zhang, Y. F., Xu, Q. X., Liao, L. D., Xu, X. E., Wu, J. Y., Wu, Z. Y., Shen, J. H., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2015). Association of mu-opioid receptor expression with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the esophagus\official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*, 28(2), 196–203. <https://doi.org/10.1111/dote.12165>
36. Zylla, D., Gourley, B. L., Vang, D., Jackson, S., Boatman, S., Lindgren, B., Kuskowski, M. A., Le, C., Gupta, K., & Gupta, P. (2013). Opioid requirement, opioid receptor expression, and clinical outcomes in patients with advanced prostate cancer. *Cancer*, 119(23), 4103–4110. <https://doi.org/10.1002/cncr.28345>

Figura 1: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão de receptores opioide Mu e Kappa e de Ki67 em tecido epitelial de mucosa oral (controle), displasias e carcinoma de células escamosas em cavidade oral.



Fonte: Acervo Pessoal. HE = Hematoxilina e eosina (a, b, c), Ki67 (d, e f) RMO = receptor mu opioide (g, h, i), RKO = receptor kappa opioide (j, k l).

Figura 2: Curva de relação entre a sobrevida global com a imunexpressão de RKO citoplasmático.

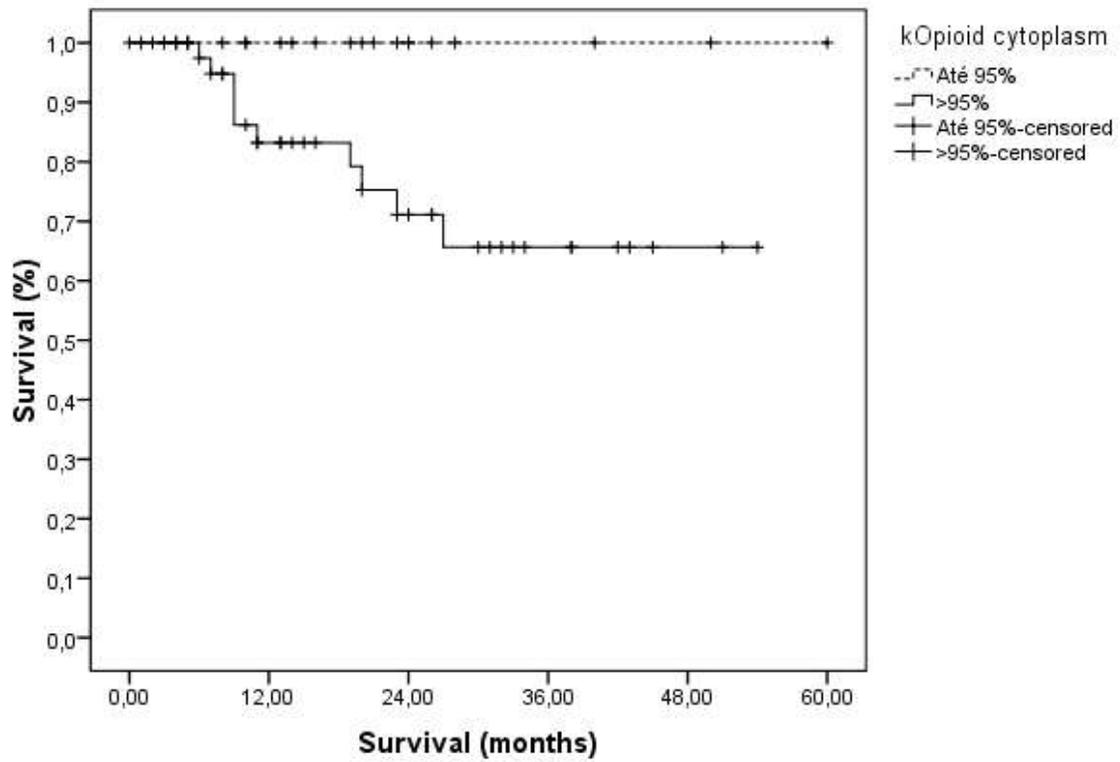


Tabela 1: Caracterização da imunexpressão dos receptores RMO e RKO em tecido epitelial sem alterações (controle), displasia e CCE de boca.

	Grupo			p-Valor
	Controle	Displasia	CCE	
μOpioide				
Membrana	0.00±0.00	0.02±0.09	0.00±0.00	0.124
Nuclear	0.31±1.09	23.23±31.38*	1.25±6.80*†	<0.001
Citoplasmática	0.55±2.48	36.09±39.78*	56.07±39.39*†	<0.001
κOpioide				
Membrana	0.04±0.20	0.04±0.16	0.00±0.00	0.120
Nuclear	1.76±4.08	10.77±26.20*	47.05±42.56*†	<0.001
Citoplasmática	33.93±30.21	70.38±40.11*	83.78±27.82*†	<0.001
Ki67	7.81±7.5	10.80±11.31*	73.00±38.00*†	<0.001

*p<0,05 versus controle; †p<0,05 versus displasia; teste Kruskal-Wallis/Dunn (media ± DP). CCE: Carcinoma de Células Escamosas

Tabela 2: Caracterização da imunexpressão dos receptores RMO e RKO entre os diferentes graus de displasias.

	Grau da displasia			p-Valor
	Leve	Moderada	Severa	
μOpioide				
Membrana	0.03±0.12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.655
Nuclear	26.02±28.34	31.33±41.43	0.00±0.00	0.224
Citoplasmática	35.54±38.31	43.45±41.64	25.00±50.00	0.818
κOpioide				
Membrana	0.69±2.11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.459
Nuclear	8.85±24.57	16.56±34.91	6.86±13.71	0.845
Citoplasmática	74.48±37.89	80.92±34.76	32.88±47.15	0.308

*p<0,05 versus controle; †p<0,05 versus displasia; teste Kruskal-Wallis/Dunn (media ± DP).

Tabela 3: Associação entre a imunexpressão dos receptores RMO e RKO e de Ki67 com os dados sociodemográficos e clínico-patológicos dos pacientes das amostras analisadas de CCE de boca.

	μ Opioide		κ Opioide		Ki67	
	n	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo
Sexo						
Masculino	35	1.06±6.07	55.56±37.89	44.78±43.79	88.13±24.57	35.51±18.00
Feminino	15	1.60±8.14	57.05±42.88	51.59±40.47	75.08±32.16	34.25±16.95
p-Valor^a		0,748	0,877	0,518	0,055	0,810
Idade						
Até 60	26	0.27±1.77	58.31±37.07	43.95±43.59	82.32±30.05	37.04±17.65
>60	24	2.52±10.07	53.15±42.63	51.22±41.45	85.73±24.83	31.74±17.11
p-Valor^a		0,155	0,575	0,468	0,604	0,299
Histórico de fumo						
Não	36	1.66±8.31	64.43±37.53	55.06±41.91	82.71±27.71	36.85±17.53
Sim	14	1.04±6.01	51.97±39.99	43.05±42.73	84.31±28.13	34.32±17.65
p-Valor^a		0,712	0,197	0,252	0,817	0,642
Histórico de etilismo						
Não	37	1.51±7.85	54.24±39.57	46.35±41.55	83.83±26.37	30.36±15.66
Sim	13	0.55±2.53	60.85±39.45	48.99±46.29	83.63±32.20	44.47±17.53
p-Valor		0,586	0,517	0,813	0,978	0,005
Localização						
Assoalho de boca	14	1.19±7.02	49.85±40.34	47.36±40.22	83.54±27.15	33.25±17.12
Língua	26	0.45±2.28	55.26±40.82	45.24±44.64	81.49±31.29	38.63±17.53
Outros	10	2.77±10.74	72.00±31.85	49.48±46.79	88.29±23.94	33.90±19.24
p-Valor^b		0,578	0,190	0,954	0,756	0,622

*p<0,05, ^aTeste de Mann-Whitney; ^bTeste Kruskal-Wallis/Dunn (média±DP).

Tabela 4: Associação entre a imunexpressão dos receptores RMO e RKO e de Ki67 com os dados clínico-patológicos dos pacientes das amostras analisadas de CCE de boca.

	n	μOpioide		κOpioide		Ki67
		Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo
Gradação histológica						
Bem diferenciado	3	0.00±0.00	64.85±29.80	21.75±40.23	80.25±30.96	30.39±26.26
Moderadamente diferenciado	45	1.46±7.34	53.88±39.97	48.79±42.96	83.25±28.58	34.33±16.59
Pobrememente diferenciado	2	0.00±0.00	74.01±42.69	55.21±36.47	94.80±8.61	52.01±14.05
p-Valor^a		0,810	0,470	0,304	0,642	0,206
Estadiamento T						
1	4	0.00±0.00	2.75±5.50*	25.01±32.80	79.39±24.89	22.77±7.22
2	18	0.46±2.32	48.80±40.03	37.50±39.29	77.65±32.43	37.28±18.86
3	12	2.31±9.80	63.50±38.20	52.23±47.31	94.90±14.54	30.17±17.79
4	16	1.43±7.71	65.08±36.33	55.40±42.62	82.73±29.37	37.69±16.92
p-Valor^a		0,825	<0,001	0,303	0,240	0,389
Estadiamento N						
0	30	0.00±0.00	47.56±40.72	47.22±41.73	85.85±23.96	34.33±17.58
1	10	2.77±10.72	62.83±41.21	43.14±39.68	76.54±31.64	33.11±16.09
2	10	2.05±8.38	63.62±35.51	49.08±46.55	85.24±30.54	36.69±18.50
p-Valor^a		0,323	0,222	0,913	0,534	0,872
Estádio Clínico						
1	4	0.00±0.00	3.67±6.35*	23.02±39.88	89.23±18.65	10.05±22.73
2	19	0.00±0.00	38.15±38.23	37.85±37.60	75.06±31.61	22.77±7.22
3	11	0.00±0.00	62.97±42.23	41.52±42.66	84.47±29.36	41.75±18.19
4	10	2.20±8.97	62.42±36.27	53.85±44.03	85.81±26.83	31.66±16.69
p-Valor^a		0,590	0,019	0,410	0,662	0,378
Tratamento realizado						
Cirurgia	7	0.00±0.00	37.49±42.30	21.71±34.25	75.95±34.75	31.84±18.86
Cirurgia + RT	21	1.66±7.57	59.07±39.75	51.20±42.55	83.79±26.47	37.97±15.60
Cirurgia + RT + QT	12	1.30±7.34	57.76±38.29	49.16±43.75	86.87±27.28	33.57±19.33
p-Valor^a		0,805	0,300	0,144	0,565	0,635
Óbito						
Não	40	1.44±7.29	57.90±39.76	45.59±41.58	81.33±29.13	34.69±16.87
Sim	10	0.00±0.00	43.96±36.42	56.58±49.80	99.70±0.95*	37.08±21.62
p-Valor^b		0,538	0,300	0,451	0,041	0,726

*p<0,05 versus demais grupos de comparação, ^aTeste Kruskal-Wallis/Dunn; ^bTeste de Mann-Whitney (média±DP).

Tabela 5: Correlação da coexpressão dos receptores opioides, em suas diferentes localizações, e expressão de Ki67 nuclear.

	Ki67 nuclear (%)
Controle	
μOpioide	
Membrana	p=1.000(r=0.000)
Nuclear	p=1.000(r=0.000)
Citoplasmática	p=1.000(r=0.000)
κOpioide	
Membrana	p=1.000(r=0.000)
Nuclear	p=0.091(r=0.634)
Citoplasmática	p=0.500(r=0.708)
Displasia	
μOpioide	
Membrana	p=0.188(r=0.299)
Nuclear	p=0.745(r=-0.075)
Citoplasmática	p=0.288(r=-0.243)
κOpioide	
Membrana	p=0.486(r=0.157)
Nuclear	p=0.063(r=0.403)
Citoplasmática	p=0.117(r=0.344)
CCE	
μOpioide	
Membrana	p=1.000 (r=0.000)
Nuclear	p=0.546 (r=0.086)
Citoplasmática	p=0.019 (r=0.328)*
κOpioide	
Membrana	p=1.000 (r=0.000)
Nuclear	p=0.978 (r=0.004)
Citoplasmática	p=0.474 (r=-0.104)

*p<0.05, correlação de Spearman.

3.2 Capítulo 2

A imunomarcção de receptores Mu e Kappa opioides influencia o prognóstico do carcinoma de células escamosas da orofaringe: um estudo observacional transversal.

Thinali Sousa Dantas^{1,2}

Paulo Goberlânio de Barros Silva^{1,2,4}

Ana Paula Negreiros Nunes Alves¹

Maria do Perpétuo Socorro Saldanha Cunha⁴

Mário Rogério Lima Mota²

Renata Ferreira de Carvalho Leitão³

Fabrcio Bitu Sousa^{1,2,4}

¹Laboratório de Patologia Bucal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Departamento de Odontologia, Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

⁴Instituto do Câncer do Ceará, Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Autor de Correspondência:

Paulo Goberlânio de Barros Silva

Curso de Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Rua João Adolfo Gurgel, número 133, 60190-060, Fortaleza, Ceará, Brasil; Telefone 1 / Fax: +55 85 32658100. E-mail: paulo_goberlanio@yahoo.com.br

Resumo

Objetivo: Caracterizar a imunoexpressão dos receptores opioides μ (RMO) e κ (RKO) em carcinoma espinocelular da orofaringe (CECO), correlacionando com fatores prognósticos, marcador de proliferação e morte celular. **Materiais e Métodos:** Estudo observacional, retrospectivo, no qual foram selecionados 50 pacientes submetidos a ressecção tumoral de CECO. Foram coletados dados sociodemográficos e clínico-patológicos e as biópsias excisionais para realização de imuno-histoquímica através de *Tissue Microarray* (TMA) para receptores opioides (Mu, Kappa), Ki67 e Caspase-3 em tumor primário, perilesão e metástase nodal. A porcentagem de imunomarcção foi calculada e associada com demais variáveis por meio dos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, correlação de Spearman,

um maior risco de morte e RKO nuclear foi associado a maior a sobrevida global, podendo ser um fator prognóstico no CECO.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas, receptor μ opioide, receptor Kappa opioide, prognóstico, sobrevida

Introdução

O câncer representa uma doença de grande preocupação devido à sua alta incidência e elevada mortalidade, sendo, atualmente, considerado a segunda maior causa de morte no mundo, apresentando grande relevância em pesquisas científicas (INCA, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de média e baixa renda (Souza et al., 2011).

O câncer de cabeça e pescoço é a quinta neoplasia mais frequente no mundo, apresentando mais de 500.000 novos casos anualmente (INCA, 2020). O carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço é o tipo histológico mais presente na população brasileira, e, dentre as localizações mais prevalentes, há um destaque para a orofaringe (INCA, 2020).

Esse tumor possui como fatores etiológicos o consumo de tabaco associado ou não ao álcool e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (Taberna et al, 2017). Dentre os tumores associados ao HPV, o CEC representa cerca de 25% e surge em locais específicos como as amígdalas e a base da língua. Esses locais constituem até 80% de todos os CECs de orofaringe, sendo tratados pela OMS como uma entidade patológica distinta de outros tumores de cabeça e pescoço (Lydiatt et al., 2017). No Ceará, existe uma alta incidência dessa neoplasia, e a procura por um serviço especializado por parte dos pacientes se dá quando a doença se encontra em estado avançado, resultando em tratamentos mutilantes e dolorosos (Dantas et al., 2016).

As taxas de sobrevida em cinco anos do CECO é aproximadamente 50%, e a maioria desses pacientes sobrevive pouco tempo após o diagnóstico (Oliveira Filho et al., 2021). Isso se deve ao fato de que a maioria dos tumores é identificada tardiamente, comprometendo o tratamento, o prognóstico e a sobrevida dos pacientes. Além disso, estudos demonstram que os tumores de orofaringe estão fortemente associados à metástase

2017). Anomalias no p16 estão associadas a uma série de mutações genéticas, causando um aumento no grau de diferenciação e multiplicação celular paralelamente gerando também um progresso e desenvolvimento do câncer. Os tumores de orofaringe com DNA do HPV (denominado p16 positivo) tendem a ter um melhor prognóstico do que aqueles sem o HPV (p16 negativo), sendo essas entidades estadiadas separadamente (Lu, Wajapeyee, Turker & Glazer, 2014). Outras proteínas também têm sido alvo de pesquisas no desenvolvimento e progressão do câncer, inclusive receptores opioides (Yeager & Colacchio 1991; Tegeder et al. 2003; Koodie, Ramakrishnan & Roy, 2010).

Os opioides são os medicamentos mais eficazes atualmente disponíveis para o manejo da dor oncológica (Gach, Wyrebska, Fichna & Janecka, 2011). A administração de morfina em pacientes oncológicos, além de um potente efeito analgésico, pode alterar o desenvolvimento do tumor, inibindo ou estimulando a progressão do câncer, por meio de diversos mecanismos, muitos dos quais associados à ativação dos receptores opioides (Afsharimani, Cabot & Parat, 2011). Vários estudos descrevem que a expressão desses receptores se encontra aumentada em vários tipos de câncer (Madar et al. 2007; Nylund et al, 2008; Lennon et al, 2012; Zylla et al. 2013), especialmente em tumores metastáticos (Singleton, Ligen, Feket, Garcia & Moss, 2015), o que sugere que ligantes endógenos ou opioides utilizados para analgesia podem promover a progressão do câncer.

Esses receptores também podem estar relacionados ao desenvolvimento e progressão de tumores malignos, controle do ciclo celular e enzimas de correção gênica influenciando no prognóstico de uma série de tumores (Brinkman & Wong, 2006; Jadotte, & Schwartz 2012). No entanto, a relação dos receptores opioides com a carcinogênese e o prognóstico do CECO é pobremente descrita na literatura e ainda não é totalmente elucidada e conclusiva, tornando-se uma importante fonte de pesquisa no campo oncológico.

Portanto, o objetivo deste estudo é caracterizar a imunoexpressão dos receptores opioides μ (RMO) e κ (RKO) em CEC de orofaringe, correlacionando com fatores prognósticos e marcadores de proliferação e morte celular.

Materiais e métodos

Tipo de estudo e delineamento amostral

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, de corte transversal, aprovado no comitê de ética em pesquisa do Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC) com número de parecer 1.552.674, no qual foram selecionados 50 pacientes que se submeteram a cirurgia de ressecção de CEC em região de orofaringe. Foram avaliados

Essa amostra foi obtida através do cálculo amostral baseado no estudo de Singleton et al. (2014), que observaram uma média de células imunopositivas para o RMO em câncer de pulmão não metastático de 1.24 ± 0.25 (média \pm EPM) e de 2.00 ± 0.20 (média \pm EPM) para cânceres pulmonares metastáticos, estimando-se necessário avaliar um total de 50 casos a fim de se obter uma amostra que pudesse validar com 80% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa de que o comportamento biológico dos cânceres é influenciado pela expressão de receptores de opioides.

Coleta de dados clínico-patológicos

Foram avaliados, também, dados sociodemográficos, como idade, sexo, histórico familiar de câncer, consumo prévio de álcool ou fumo. Foi realizado um novo estadiamento tumoral de acordo com Comitê Conjunto Americano de Estadiamento de Câncer (Lydiatt et al., 2017). Todos os dados foram fornecidos pelos prontuários e laudos histopatológicos dos pacientes.

Também foi calculada a sobrevida global, obtida através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) e a data do óbito (dia, mês e ano) ou final do *follow up* utilizando para fins de análise estatística a quantidade de meses entre essas datas (Dantas et al., 2016).

Após a seleção da amostra, foram levantadas as lâminas histológicas das biópsias excisionais para revisão e reclassificação da gradação tumoral por um patologista experiente.

Confecção de blocos de Tissue Microarray e Reação de imuno-histoquímica

Foram selecionadas lâminas que representassem: uma área da biópsia excisional com parênquima tumoral adequado representando o *front* tumoral e que representasse de maneira satisfatória todo o tumor primário (TP); epitélio escamoso de margem de ressecção cirúrgica (MRC), além de amostra de metástase em linfonodos cervicais (ML) para aqueles pacientes que apresentaram essa condição (Oliveira Filho et al., 2021). Após a seleção das lâminas, seus respectivos blocos (bloco doador) foram levantados para a confecção do bloco de TMA (bloco receptor).

Para técnica de TMA, um dispositivo técnico chamado “tissue microarrayer” (Quick-Ray UNITMA®) foi utilizado. Com esse dispositivo, punciona-se um fragmento de tecido com 2 mm de diâmetro, com maior representatividade do bloco doador e transferido de maneira ordenada para o bloco receptor que apresenta um padrão de matriz precisamente espaçada.

O bloco receptor foi então, em uma mesma sessão, submetido a cortes

tampão de fosfato (PBS), foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS, novas lavagens na solução tampão e incubação *overnight* com os anticorpos antirreceptor, antirreceptor Mu opioide (1:100, clone UMB3, Abcam®) e antirreceptor Kappa opioide (1:750, clone ab138734, Abcam®) anti-Ki67 (DAKO®, MIB-2, pronto para uso), anti-Caspase-3 (Abcam®, 1:100) e anti-p16 (DAKO®, E6H4, pronto para uso), este último utilizado para reclassificação de estadiamento patológico dos tumores em p16+ e p16- (Lydiatt et al., 2017).

Após o anticorpo primário por tempo determinado pelo fabricante, as lâminas foram lavadas (PBS) e incubadas com anticorpo biotilado por 30 min e, após lavagem, com conjugado de peroxidase avidina-biotina ou sistema Envision® por 30 min. A revelação foi realizada por meio de utilização de 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) (DAKO®) e a contracoloração com hematoxilina de Harris.

Foram feitos controles positivos da reação de imuno-histoquímica por cortes histológicos convencionais (cérebro humano e linfonodos), conforme sugerido pelo fabricante e, para controle negativo, lâminas de TMA, utilizando a mesma técnica de imuno-histoquímica descrita anteriormente, porém omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário.

Análise Imuno-histoquímica

Para avaliação microscópica, foram fotografados cinco campos por corte histológico em um aumento de 400x através de um microscópio com câmera acoplada (Leica DM 2000®) (Zhang et al., 2015).

Para avaliação quantitativa dos marcadores anti Mu-opoide e anti K opioide, as imagens foram exportadas para o software ImageJ®, e através do comando cell counter, para determinação da porcentagem de células tumorais marcadas e não marcadas, além da localização celular dessa marcação, se em citoplasma, núcleo ou membrana.

Para avaliação quantitativa de Ki67, as células eram consideradas positivas quando havia coloração amarronzada em núcleo celular. Para avaliação quantitativa de Caspase-3, a coloração marrom do citoplasma das células foi considerada. Para a análise de p16, as amostras foram consideradas positivas quando a coloração nuclear e citoplasmática forte e difusa foi detectada em pelo menos 75% das células tumorais (Oliveira Filho, 2021).

Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), no qual as análises foram realizadas

Foram criadas curvas de Kaplan-Meier para calcular o tempo médio e mediana de sobrevida global e taxas de sobrevida em 10 anos, as quais foram comparadas pelo teste Log-Rank Mantel-Cox. Análise multivariada (regressão de Cox) foi utilizada para determinar os marcadores independentemente associados a sobrevida global.

Resultados

Aumento da Imunoexpressão de receptores de opioides, Ki67 e Caspase-3 no CECO

A amostra foi constituída por 25 MRCs, 29 CECOs p16-, 21 CECOs p16+ e 25 MLs, das quais 16 eram p16- e 9 eram p16+. Nenhuma amostra mostrou positividade membranar para o RMO, mas todas as amostras tiveram positividade desse receptor em citoplasma ou núcleo (Tabela 1) (Figura 1).

A imunoexpressão para o RMO foi significativamente superior nos tumores primários e ML em comparação às MRCs ($p < 0.001$). A expressão citoplasmática do RMO mostrou aumento nos tumores primários e ML p16- em comparação com os tumores primários e ML p16+, e todos esses grupos tiveram maior expressão que as MRCs ($p = 0.028$) (Tabela 1) (Figura 1).

Apenas os epitélios das MRCs apresentaram positividade membranar para o RKO ($p = 0.672$). A imunoexpressão citoplasmática do RKO foi superior nos tumores primários e ML p16+ e p16- em comparação às margens cirúrgicas ($p < 0.001$). Porém, não houve diferença entre os tecidos com relação a imunoexpressão nuclear para esse receptor ($p = 0.250$) (Tabela 1) (Figura 1).

A imunoexpressão para Ki67 ($p = 0.012$) e Caspase-3 ($p < 0.001$) foi significativamente superior tanto nos tumores primários quanto em ML em comparação às margens cirúrgicas.

Influência dos receptores de opioides, Ki67 e Caspase-3 nas características clínico-patológicas CECO p16- e p16 +

Nos tumores p16-, a imunoexpressão para RMO em núcleo foi maior nos pacientes sem histórico de etilismo ($p = 0.046$) e em citoplasma nos pacientes sem histórico familiar de câncer ($p = 0.025$). Já o RKO em núcleo foi significativamente superior nos homens ($p = 0.026$) e em citoplasma nos pacientes sem histórico de fumo ($p = 0.041$) e sem histórico de etilismo ($p = 0.012$). A imunoexpressão para Ki67 e Caspase-3 não mostrou variações significantes com relação aos aspectos clínico-patológicos dos pacientes (Tabela 2).

Nos tumores p16-, a baixa expressão para Caspase-3 aumentou significativamente a sobrevida global ($p=0.037$), mas nos tumores p16+ nenhum marcador ou característica clínico-patológica influenciou significativamente no prognóstico (Tabela 4).

Em análise multivariada, a expressão do RMO em núcleo foi diretamente associada a menor risco de morte ($p=0.048$), e do RKO em núcleo com maior risco de morte ($p=0.046$) (Tabela 5).

Discussão

Este estudo evidenciou a imunexpressão de receptores opioides em diferentes localizações celulares em CEC de orofaringe, além de demonstrar a relação desses receptores com fatores de prognóstico, incluindo a sobrevida dos pacientes.

Na literatura, encontrou-se uma forte ligação entre receptores opioides, carcinogênese e progressão tumoral (Kuzumaki et al., 2012; Chen et al, 2017; Wang et al., 2020). Além disso, o uso de agonistas opioides pode influenciar diretamente a proliferação, apoptose e potencial metastático de células cancerosas (Boland, 2014). No entanto, devido à heterogeneidade de metodologias, tipos tumorais e receptores estudados, ainda há resultados muito conflitantes sobre o tema. Este trabalho é o primeiro que avalia a imunexpressão de RMO e RKO em CEC de orofaringe.

Já é bem estabelecida a presença de receptores opioides em mucosa do trato gastrointestinal, glândulas adrenais, rins, pulmões, baço, testículos, ovários, útero, fígado (Schreiber, Bartoszyk & Kunzelmann, 2004; Sobczak, 2014), mas a literatura não mostra evidências da presença desses receptores em tecido epitelial de orofaringe (Charbaji, Schafer-Korting & Kuchler, 2012). Este estudo mostra que os receptores opioides são expressos em citoplasma e núcleo, tanto em MRC como em TP e ML.

A expressão desses receptores em localização citoplasmática e nuclear das células epiteliais já foi evidenciada, como no estudo de Bigliardi-Qi, Sumanovski, Buchner, Rufli & Bigliardi, (2004), Taneda et al., 2011 e Kupczyk et al., (2017) que demonstraram a presença de receptores opioides em pele normal, tanto RMO como RKO. Este trabalho demonstrou que tanto por biologia molecular como por imuno-histoquímica, a localização predominante ocorre em camada basal e suprabasal, e a sublocalização celular em citoplasma e em membrana.

Há poucos trabalhos que estudam a imunexpressão de RMO e RKO em CEC, e nenhum trabalho que os estuda em CECO. Similar a esses achados, Zhang et al, (2013), (2015) são os primeiros que demonstram que receptores opioides estão mais expressos em

superior nos tumores primários e ML p16+ e p16- em comparação às MRCs, similar ao descrito por Zhang et al. (2013), apesar de os mecanismos que medeiam a superexpressão de RKO em citoplasma de CECs e seu significado biológico ainda permanecerem obscuros.

Não há, na literatura, associação entre a etiopatogenia dos CECs com a regulação de RMO, porém, no estudo de Xu et al. (2017), foi observada uma interação significativa entre o pleomorfismo genético nos genes relacionado a tradução de RMO, aumento do risco de desenvolver CEC em esôfago e consumo de álcool e cigarros. Esse pleomorfismo parece aumentar o risco de CEC em esôfago em pacientes jovens, sem fatores de risco clássicos e com histórico familiar de câncer (Wang et al., 2013). Mesmo que tumores de orofaringe p16- tenham etiopatogenia relacionada a fumo e álcool, este trabalho não observou uma associação direta entre o aumento de RMO nos tumores p16- e o histórico de fumo e etilismo. Interessantemente também foi verificado nos resultados que, independentemente de os tumores serem p16- ou +, a imunoposição para RKO em núcleo foi significativamente superior nos homens e em citoplasma nos pacientes com histórico de fumo e sem histórico de etilismo.

Nos tumores p16+, apenas o RMO em núcleo e em citoplasma mostraram aumento de expressão nos pacientes sem histórico familiar de câncer. Não há, na literatura, evidências que indiquem que tumores com etiopatogenia por HPV estejam relacionados com regulação de receptores opioides. Porém é sabido que o HPV utiliza a mesma via de sinalização relacionada a progressão tumoral atribuída a ativação de receptores opioides: a via Pi3K/AkT/mTOR (Liu et al., 2021). Esses autores observaram que a naltrexona, um importante antagonista de receptores opioides, regulou negativamente essa via, inibindo o crescimento de células malignas de tumores cervicais.

Neste trabalho, também foi observado que a imunoposição para Ki67 e Caspase-3 foi significativamente superior nos tumores primários e ML comparando com MRC, e que a baixa imunoposição de Caspase-3 está relacionada ao aumento da sobrevivência dos pacientes. As Caspases são uma classe de cisteína proteases que se dividem principalmente em dois grupos de acordo com suas funções na apoptose (caspase-3/6/7/8/9) e na inflamação (caspase-1/4/5/12) (Abu-Qare & Abou-Donia, 2001) Essas proteínas estão altamente associadas ao desenvolvimento do câncer, apesar de o seu papel na progressão tumoral ainda permanecer controverso. Níveis baixos de expressão ou inativação de Caspases frequentemente ocorrem em células cancerosas e tornam as células resistentes a estresses e tratamentos microambientais (Janakiraman et al., 2017; Hu et al., 2020). Por outro lado, a superexpressão de Caspases em célula pode liberar sinais estimuladores de

Em se tratando de RMO, uma associação significativa entre a expressão de RMO no citoplasma e metástases em linfonodos de CEC de esôfago foi encontrada no estudo de Zhang et al. (2015), sugerindo que o RMO está envolvido na progressão tumoral. Kosciuczuk et al. (2020), também demonstraram aumento de proliferação celular em câncer de pulmão associado à ativação de RMO, sugerindo que ele tem papel importante na modulação das MAPKs (ERK1/2 e p38) e a expressão das proteínas supressoras de tumor, PTEN e p53, resultando na supressão da via PI3K/AKT (Kharmat, Rajput, Lin & Kumar, 2013; Madishetti et al, 2013), sendo estas as principais vias de ativação que podem estar relacionadas a progressão tumoral relacionada com receptores opioides. No entanto, nos resultados deste estudo, nos tumores p16-, na análise multivariada, a expressão de RMO em núcleo foi diretamente associada a menor risco de morte.

Já em outro estudo, foi observado um efeito inibitório da morfina sobre células tumorais, relacionado à ativação de RMO, causando diminuição da angiogênese mediado pela mesma via de ativação, na qual há a inibição do fator induzido por hipóxia (HIF-1) (Koodie et al., 2010). Por outro lado, Kerros, Cavey, Sola, Jauzac & Allouche (2007), estudando linhagens celulares de mieloma múltiplo, mostrou que não há uma relação do aumento da apoptose dessas células diante de uma regulação positiva de receptores opioides.

O trabalho de Zhang et al. (2013) demonstrou uma associação significativa entre a alta expressão de KOR nuclear e metástases em linfonodos em CEC de esôfago, havendo prognóstico significativamente pior do que aqueles com baixa expressão de RKO nuclear. Neste estudo, foi observado que a imunoexpressão de RKO é fator de risco para morte no CCE de orofaringe. No entanto, Chen et al, 2017, avaliando carcinomas hepatocelulares, verificaram que uma menor expressão de mRNA de RKO em tumores foi significativamente associada a maior agressividade tumoral e menor sobrevida.

Agonistas RKO parecem inibir a angiogênese induzida por tumor por supressão na síntese de VEGF em ensaios in vivo (Yamamizu, 2013; Yamamizu, Hamada & Narita, 2015), e esses efeitos são abolidos pelo cotratamento com o antagonista RKO seletivo (Kuzumaki et al., 2012).

Semelhante às correlações observadas entre RMO e KRO, os receptores opioides podem interagir entre si por meio de mediação da transferência de sinal para as proteínas G (Georgoussi, Georganta & Milligan, 2012). Isso faz com que os receptores opioides μ e κ possam se comportar como antagonísticos, fornecendo uma nova visão sobre o papel do tráfego do receptor de opioides na sinalização em CEC de orofaringe (Bohn et al., 2000).

Apesar de algumas limitações serem reconhecidas neste trabalho, como o desenho retrospectivo do estudo, a impossibilidade de avaliação sobre o uso crônico de

tenham sido descritas em várias células cancerosas, seus significados biológicos permanecem obscuros.

Assim, concluiu-se que a imunexpressão de RMO e RKO está aumentada nos tecidos tumorais, e a expressão nuclear de RMO está relacionada com menor risco de morte e RKO com maior risco, podendo confirmar uma relação entre marcadores opioides e o prognósticos no COCE.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará e ao Hospital Haroldo Juaçaba, pois, sem estes, certamente não seria possível a realização desta Pesquisa.

Referências

1. Abu-Qare, A. W., & Abou-Donia, M. B. (2001). Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 4(3), 313-332. doi: 10.1080/109374001301419737
2. Afsharimani, B., Cabot, P., & Parat, M. O. (2011). Morphine and tumor growth and metastasis. *Cancer and metastasis reviews*, 30(2), 225-238. doi: 10.1007/s10555-011-9285-0
3. Alvarenga, L. D. M., Ruiz, M. T., Pavarino-Bertelli, É. C., Ruback, M. J. C., Maniglia, J. V., & Goloni-Bertollo, M. (2008). Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 74(1), 68-73. doi: 10.1016/s1808-8694(15)30753-9
4. Apolone, G., Corli, O., Caraceni, A., Negri, E., Deandrea, S., Montanari, M., & Greco, M. T. (2009). Pattern and quality of care of cancer pain management. Results from the Cancer Pain Outcome Research Study Group. *British journal of cancer*, 100(10), 1566-1574. doi: 10.1038/sj.bjc.6605053
5. Barbera, L. C., Seow, H., Husain, A., Howell, D., Atzema, C., Earle, C., ... & Dudgeon, D. J. (2011). How often are opioids prescribed for cancer patients reporting pain? Results of a population-based analysis. *Journal of Clinical*

7. Bohn, L. M., Belcheva, M. M., & Coscia, C. J. (2000). μ -Opioid Agonist Inhibition of κ -Opioid Receptor-Stimulated Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation Is Dynamin-Dependent in C6 Glioma Cells. *Journal of neurochemistry*, 74(2), 574-581. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.740574.x
8. Boland, J. W., McWilliams, K., Ahmedzai, S. H., & Pockley, A. G. (2014). Effects of opioids on immunologic parameters that are relevant to anti-tumour immune potential in patients with cancer: a systematic literature review. *British journal of cancer*, 111(5), 866-873. doi: 10.1038/bjc.2014.384
9. Brasil, Câncer, IN, Silva, JAG. (2018) Estimativa 2014, Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Inca, 118.
10. Brinkman, B. M., & Wong, D. T. (2006). Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Current opinion in oncology*, 18(3), 228-233. doi: 10.1097/01.cco.0000219250.15041.f8
11. Charbaji, N., Schäfer-Korting, M., & Küchler, S. (2012). Morphine stimulates cell migration of oral epithelial cells by delta-opioid receptor activation. *PLoS One*, 7(8), e42616. doi: 10.1371/journal.pone.0042616
12. Chen, C., Farooqui, M., & Gupta, K. (2006). Morphine stimulates vascular endothelial growth factor-like signaling in mouse retinal endothelial cells. *Current Neurovascular Research*, 3(3), 171-180. doi: 10.2174/156720206778018767
13. Chen, D., Chen, Y., Yan, Y., Pan, J., Xing, W., Li, Q., & Zeng, W. (2017). Down-regulation of the tumour suppressor κ -opioid receptor predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *BMC cancer*, 17(1), 1-11. doi: 10.1186/s12885-017-3541-9
14. Chong, W. S., & Johnson, D. S. (2012). UPDATE ON OPIOID PHARMACOLOGY ANAESTHESIA TUTORIAL OF THE WEEK.
15. Costa, A. P. P. Avaliação das Respostas de Receptores Opioides δ (RODs) à Estimulação Agonista Aguda e Crônica a Fim de Estimar Tolerância Celular Adquirida. doi: 10.13140/RG.2.1.1876.8728
16. Dantas, T. S., de Barros Silva, P. G., Sousa, E. F., da Cunha, M. D. P., de Aguiar, A. S. W., Costa, F. W. G., ... & Sousa, F. B. (2016). Influence of educational level, stage, and histological type on survival of oral cancer in a Brazilian population: a retrospective study of 10 years observation *Medicine* 95(3). doi:

18. Farooqui, M., Li, Y., Rogers, T., Poonawala, T., Griffin, R. J., Song, C. W., & Gupta, K. (2007). COX-2 inhibitor celecoxib prevents chronic morphine-induced promotion of angiogenesis, tumour growth, metastasis and mortality, without compromising analgesia. *British journal of cancer*, 97(11), 1523-1531. doi: 10.1038/sj.bjc.6604057
19. Fujioka, N., Nguyen, J., Chen, C., Li, Y., Pasrija, T., Niehans, G., ... & Gupta, K. (2011). Morphine-induced epidermal growth factor pathway activation in non-small cell lung cancer. *Anesthesia and analgesia*, 113(6), 1353. doi: 10.1213/ANE.0b013e318232b35a
20. Gach, K., Wyrębska, A., Fichna, J., & Janecka, A. (2011). The role of morphine in regulation of cancer cell growth. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 384(3), 221-230. doi: 10.1007/s00210-011-0672-4
21. Galbiatti, A. L. S., Padovani-Junior, J. A., Maníglia, J. V., Rodrigues, C. D. S., Pavarino, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M. (2013). Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 79(2), 239-247. doi: 10.5935/1808-8694.20130041
22. Georgoussi, Z., Georganta, E. M., & Milligan, G. (2012). The other side of opioid receptor signalling: regulation by protein-protein interaction. *Current drug targets*, 13(1), 80-102. doi: 10.2174/138945012798868470
23. Gupta, K., Kshirsagar, S., Chang, L., Schwartz, R., Law, P. Y., Yee, D., & Hebbel, R. P. (2002). Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer research*, 62(15), 4491-4498. pmid: 12154060
24. Hu, Y. J., Sun, W. W., Zhao, T. C., Liu, Y., Zhu, D. W., Wang, L. Z., ... & Zhong, L. P. (2020). Cyclin D1 overexpression enhances chemosensitivity to TPF chemotherapeutic agents via the caspase-3 pathway in oral cancer. *Oncology letters*, 20(5), 1-1. doi: 10.3892/ol.2020.12015
25. Jadotte, Y. T., & Schwartz, R. A. (2012). Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(2), 173-184. doi: 10.1016/j.jaad.2011.09.040
26. Janakiraman, H., House, R. P., Talwar, S., Courtney, S. M., Hazard, E. S., Hardiman, G., ... & Palanisamy, V. (2017). Repression of caspase-3 and RNA-binding protein HuR cleavage by cyclooxygenase-2 promotes drug resistance in oral squamous cell

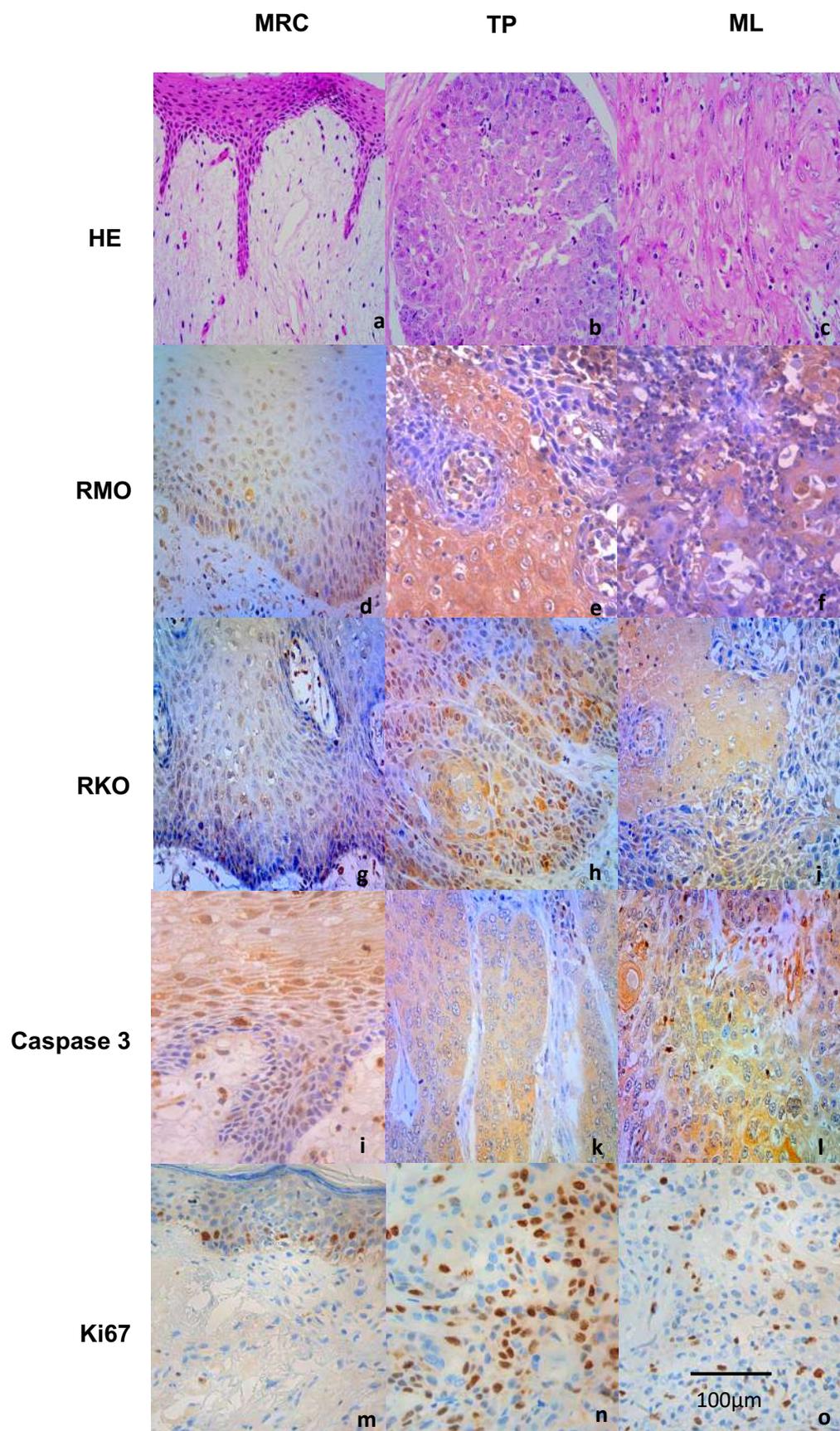
28. Kerros, C., Cavey, T., Sola, B., Jauzac, P., & Allouche, S. (2009). Somatostatin and opioid receptors do not regulate proliferation or apoptosis of the human multiple myeloma U266 cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(1), 1-11. doi: 10.1186/1756-9966-28-77
29. Koodie, L., Ramakrishnan, S., & Roy, S. (2010). Morphine suppresses tumor angiogenesis through a HIF-1 α /p38MAPK pathway. *The American journal of pathology*, 177(2), 984-997. doi: 10.2353/ajpath.2010.090621
30. Kosciuczuk, U., Knapp, P., & Lotowska-Cwiklewska, A. M. (2020). Opioid-induced immunosuppression and carcinogenesis promotion theories create the newest trend in acute and chronic pain pharmacotherapy. *Clinics*, 75. doi: 10.6061/clinics/2020/e1554
31. Kuzumaki, N., Suzuki, A., Narita, M., Hosoya, T., Nagasawa, A., Imai, S., ... & Suzuki, T. (2012). Effect of κ -opioid receptor agonist on the growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *British journal of cancer*, 106(6), 1148-1152. doi: 10.1038/bjc.2011.574
32. Kupczyk, P., Reich, A., Hołysz, M., Gajda, M., Wysokińska, E., Kobuszewska, A., ... & Szepietowski, J. C. (2017). Opioid receptors in psoriatic skin: relationship with itch. *Acta dermato-venereologica*, 97(5), 564-570. doi: 10.2340/00015555-2595
33. Lahav, Y., Cohen, O., Huszar, M., Levy, I., Cata, J. P., Halperin, D., & Shoffel-Havakuk, H. (2021). Mu-Opioid Receptor Expression in Laryngeal Cancer. *Journal of Voice*. doi: 10.1016/j.jvoice.2021.02.018
34. Lennon, F. E., Mirzapioazova, T., Mambetsariev, B., Salgia, R., Moss, J., & Singleton, P. A. (2012). Overexpression of the μ -opioid receptor in human non-small cell lung cancer promotes Akt and mTOR activation, tumor growth, and metastasis. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 116(4), 857-867. doi: 10.1097/ALN.0b013e31824babe2
35. Levins, K. J., Prendeville, S., Conlon, S., & Buggy, D. J. (2018). The effect of anesthetic technique on μ -opioid receptor expression and immune cell infiltration in breast cancer. *Journal of anesthesia*, 32(6), 792-796. doi: 10.1007/s00540-018-2554-0
36. Liu, P. F., Hu, Y. C., Kang, B. H., Tseng, Y. K., Wu, P. C., Liang, C. C., ... & Shu, C. W. (2017). Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis

38. Lu, Y., Wajapeyee, N., Turker, M. S., & Glazer, P. M. (2014). Silencing of the DNA mismatch repair gene MLH1 induced by hypoxic stress in a pathway dependent on the histone demethylase LSD1. *Cell reports*, 8(2), 501-513. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.035
39. Lydiatt, W. M., Patel, S. G., O'Sullivan, B., Brandwein, M. S., Ridge, J. A., Migliacci, J. C., ... & Shah, J. P. (2017). Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(2), 122-137. doi: 10.3322/caac.21389
40. Madar, I., Bencherif, B., Lever, J., Heitmiller, R. F., Yang, S. C., Brock, M., ... & Frost, J. J. (2007). Imaging δ - and μ -opioid receptors by PET in lung carcinoma patients. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(2), 207-213. pmid: 17268016
41. Madishetti, S., Schneble, N., König, C., Hirsch, E., Schulz, S., Müller, J. P., & Wetzker, R. (2014). PI3K γ integrates c AMP and Akt signalling of the μ -opioid receptor. *British journal of pharmacology*, 171(13), 3328-3337. doi: 10.1111/bph.12698
42. Mathew, B., Lennon, F. E., Siegler, J. H., Mirzapioazova, T., Mambetsariev, N., Sammani, S., ... & Singleton, P. A. (2011). Novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory study. *Anesthesia and analgesia*, 112(3), 558. doi: 10.1213/ANE.0b013e31820568af
43. Nguyen, J., Luk, K., Vang, D., Soto, W., Vincent, L., Robiner, S., ... & Gupta, K. (2014). Morphine stimulates cancer progression and mast cell activation and impairs survival in transgenic mice with breast cancer. *British journal of anaesthesia*, 113(suppl_1), i4-i13. doi: 10.1093/bja/aeu090
44. Nylund, G., Pettersson, A., Bengtsson, C., Khorram-Manesh, A., Nordgren, S., & Delbro, D. S. (2008). Functional expression of μ -opioid receptors in the human colon cancer cell line, HT-29, and their localization in human colon. *Digestive diseases and sciences*, 53(2), 461-466. doi: 10.1007/s10620-007-9897-y
45. Oliveira Filho, O. V. D. (2021). Influência da imunoexpressão das proteínas do sistema Mismatch repair na progressão tumoral e no prognóstico de pacientes com câncer de orofaringe. doi: 10.1007/s12105-021-01286-9
46. Schreiber, R., Bartoszyk, G. D., & Kunzelmann, K. (2004). The κ -opioid receptor agonist asimadoline inhibits epithelial transport in mouse trachea and

48. Singleton, P. A., Moss, J., Karp, D. D., Atkins, J. T., & Janku, F. (2015). The mu opioid receptor: a new target for cancer therapy?. *Cancer*, *121*(16), 2681-2688. doi: 10.1002/cncr.29460
49. Sobczak, M., Sałaga, M., Storr, M. A., & Fichna, J. (2014). Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *Journal of gastroenterology*, *49*(1), 24-45. doi: 10.1007/s00535-013-0753-x
50. Souza, L. R., Fonseca T., Oliveira Santos, C. C., Corrêa, G. T. B., Santos, F. B. G., Cardoso, C. M., ... & De Paula, A. M. B. (2011). Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. doi: 10.4317/medoral.16954
51. Taberna, M., Mena, M., Pavón, M. A., Alemany, L., Gillison, M. L., & Mesía, R. (2017). Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of Oncology*, *28*(10), 2386-2398. doi: 10.1093/annonc/mdx304
52. Taneda, K., Tominaga, M., Negi, O., Tenggara, S., Kamo, A., Ogawa, H., & Takamori, K. (2011). Evaluation of epidermal nerve density and opioid receptor levels in psoriatic itch. *British Journal of Dermatology*, *165*(2), 277-284. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10347.
53. Tegeder, I., Grösch, S., Schmidtko, A., Häussler, A., Schmidt, H., Niederberger, E., ... & Geisslinger, G. (2003). G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer research*, *63*(8), 1846-1852. pmid: 12702572
54. Van den Beuken-van Everdingen, M. H. J., De Rijke, J. M., Kessels, A. G., Schouten, H. C., Van Kleef, M., & Patijn, J. (2007). Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. *Annals of oncology*, *18*(9), 1437-1449. doi: 10.1093/annonc/mdm056
55. Wang, S., Li, Y., Liu, X. D., Zhao, C. X., & Yang, K. Q. (2013). Polymorphism of A118G in μ -opioid receptor gene is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *International journal of clinical oncology*, *18*(4), 666-669. doi: 10.1007/s10147-012-0441-5
56. Wang, H., Wen, C., Chen, S., Wang, F., He, L., Li, W., ... & Liu, H. (2020). Toosendanin-induced apoptosis in colorectal cancer cells is associated with the κ -

58. Yamamizu, K., Furuta, S., Hamada, Y., Yamashita, A., Kuzumaki, N., Narita, M., ... & Narita, M. (2013). κ Opioids inhibit tumor angiogenesis by suppressing VEGF signaling. *Scientific reports*, 3(1), 1-8. doi: 10.1038/srep03213
59. Yamamizu, K., Hamada, Y., & Narita, M. (2015). κ Opioid receptor ligands regulate angiogenesis in development and in tumours. *British journal of pharmacology*, 172(2), 268-276. doi: 10.1111/bph.12573
60. Yeager, M. P., & Colacchio, T. A. (1991). Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. *Archives of surgery*, 126(4), 454-456. doi: 10.1001/archsurg.1991.01410280056007
61. ZAGON, Ian S.; MCLAUGHLIN, Patricia J. Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. *Science*, v. 221, n. 4611, p. 671-673, 1983. doi: 10.1126/science.6867737
62. Zhang, Y. F., Xu, Q. X., Liao, L. D., Xu, X. E., Wu, J. Y., Shen, J., ... & Xu, L. Y. (2013). κ -Opioid receptor in the nucleus is a novel prognostic factor of esophageal squamous cell carcinoma. *Human pathology*, 44(9), 1756-1765. doi: 10.1016/j.humpath.2012.11.025
63. Zhang, Y. F., Xu, Q. X., Liao, L. D., Xu, X. E., Wu, J. Y., Wu, Z. Y., ... & Xu, L. Y. (2015). Association of mu-opioid receptor expression with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus*, 28(2), 196-203. doi: 10.1111/dote.12165
64. Zhang, H., Sun, M., Zhou, D., Gorur, A., Sun, Z., Zeng, W., ... & Miao, C. (2020). Increased mu-opioid receptor expression is associated with reduced disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *British journal of anaesthesia*, 125(5), 722-729. doi: 10.1016/j.bja.2020.07.051
65. Zylla, D., Gourley, B. L., Vang, D., Jackson, S., Boatman, S., Lindgren, B., ... & Gupta, P. (2013). Opioid requirement, opioid receptor expression, and clinical outcomes in patients with advanced prostate cancer. *Cancer*, 119(23), 4103-4110. doi: 10.1002/cncr.28345

Figura 1: Fotomicrografias representativas da imunexpressão de receptores opioide Mu e Kappa, Ki67 e Caspase-3 em carcinoma de células escamosas de orofaringe, em margem de ressecção cirúrgica e em metástase linfonodal.



Tabelas:

Tabela 1: Caracterização da imunoexpressão de receptores opioides, Ki67 e Caspase-3 em margem de ressecção cirúrgica, tumores primários e metástase linfonodal de CECOs p16+ e p16-.

	Ki67	Caspase3	Mu citoplasma	Mu núcleo	Kappa membrana	Kappa citoplasma	Kappa núcleo
Tecidos							
MRC (n=25)	6.44±5.41	29.96±35.15	14.65±27.18	6.71±20.62	3.48±17.97	34.90±37.34	26.48±30.98
TP p16- (n=29)	15.90±14.64*	88.31±20.88*	72.68±42.43*	38.16±45.61*	0.00±0.00*	90.89±18.50*	11.11±32.03
TP p16+ (n=21)	12.07±12.31*	94.66±13.29*	70.71±41.40*	21.33±40.46*†	0.00±0.00*	92.40±12.85*	9.90±26.96
ML p16- (n=16)	3.78±5.80†	91.00±41.14*	90.43±18.37*	28.57±48.80*	0.00±0.00*	91.00±20.09*	10.00±31.62
ML p16+ (n=9)	6.10±11.93†	90.90±21.21*	66.50±42.61*	12.50±35.36*†	0.00±0.00*	75.00±46.29*†	12.50±35.36
p-Valor^a	0.012	<0.001	<0.001	0.028	0.672	<0.001	0.250

^aKruskal-Wallis/Dunn test, *p<0.05 versus MRC; †p<0.05 versus TP (mean ±SD). MRC = margem de ressecção cirúrgica; TP = tumor primário; ML = metástase linfonodal

Tabela 2: Associação das características clínico-patológicas e fatores de risco com receptores opioides, Ki67 e Caspase-3 no CECO p16-.

	ki 67	Caspase-3	Mu citoplasma	Mu núcleo	Kappa citoplasma	Kappa núcleo
Sexo						
Masculino (n=24)	16.78±15.02	90.29±18.26	71.26±44.53	33.47±45.94	90.00±20.13	4.76±21.82
Feminino (n=5)	10.67±13.32	80.00±30.82	77.17±38.39	53.00±45.18	94.00±12.00	33.33±51.64
p-Valor^b	0.517	0.332	0.773	0.372	0.650	0.026
Idade						
≤60 (n=5)	29.50±21.92	92.40±7.96	93.83±7.33	36.33±42.75	95.00±4.58	0.00±0.00
>60 (n=24)	14.47±13.74	87.33±22.96	66.00±46.79	38.74±47.59	90.38±19.56	12.50±33.78
p-Valor^b	0.173	0.635	0.166	0.913	0.691	0.534
Histórico Familiar de Câncer						
Sim (n=5)	13.83±14.57	81.17±27.72	42.86±53.45	42.86±53.45	93.00±11.64	0.00±0.00
Não (n=24)	16.73±15.10	90.45±18.72	84.28±32.02	36.33±43.78	90.29±20.24	14.29±35.86
p-Valor^a	0.693	0.350	0.025	0.756	0.758	0.345
Histórico de Fumo						
Sim (n=6)	15.43±14.09	85.13±24.94	56.33±45.22	38.33±43.90	80.43±27.35	14.29±37.80
Não (n=23)	16.14±15.43	89.72±19.44	77.84±41.42	38.11±47.32	94.55±13.34	10.00±30.78
p-Valor^a	0.919	0.614	0.289	0.992	0.041	0.767
Consumo de Álcool						
Sim (n=5)	17.80±12.99	84.29±26.96	75.83±39.68	10.67±26.13	76.29±31.13	0.00±0.00
Não (n=24)	15.31±15.47	89.79±18.83	71.68±44.26	46.84±47.47	96.00±7.52	15.00±36.63
p-Valor^a	0.749	0.562	0.840	0.046	0.012	0.295
cT						
T1/2 (n=12)	8.71±11.34	92.00±14.51	91.75±13.01	56.75±38.87	91.70±23.89	10.00±31.62
T3/4 (n=17)	17.67±15.57	85.07±24.74	66.13±48.45	33.33±48.80	90.40±16.33	13.33±35.19
p-Valor^a	0.203	0.434	0.161	0.255	0.873	0.811
cN						
N0 (n=8)	4.40±5.90	98.88±3.18	95.83±7.05	61.00±49.05	97.56±3.75	22.22±44.10
N+ (n=21)	16.50±16.85	80.29±25.72	75.92±43.41	40.31±47.23	92.08±18.25	8.33±28.87
p-Valor^a	0.149	0.058	0.287	0.392	0.390	0.393

*p<0.05 versus outros grupos; ^ateste de Mann-Whitney; p<0.05 (média ±SD).

Tabela 3: Associação das características clínico-patológicas e fatores de risco com receptores opioides, Ki67 e Caspase-3 no CECO p16+.

	ki 67	Caspase-3	Mu citoplasma	Mu núcleo	Kappa citoplasma	Kappa núcleo
Sexo						
Masculino (n=14)	13.90±13.93	92.73±15.83	72.00±40.22	14.29±36.31	91.69±15.29	2.08±7.49
Feminino (n=7)	8.40±8.26	98.83±1.83	68.14±46.88	35.43±47.47	93.71±7.23	24.43±42.55
p-Valor^b	0.435	0.367	0.846	0.270	0.747	0.076
Idade						
≤60 (n=7)	21.75±18.39	91.67±18.98	76.00±36.90	6.86±18.14	92.50±10.31	11.83±28.99
>60 (n=14)	8.55±7.71	96.04±10.40	68.07±44.56	28.57±46.88	92.36±14.16	9.07±27.14
p-Valor^b	0.032	0.521	0.690	0.257	0.983	0.840
Histórico Familiar de Câncer						
Sim (n=7)	16.60±17.59	89.60±20.57	38.29±48.05	0.00±0.00	96.71±8.69	14.29±37.80
Não (n=14)	9.80±9.00	96.46±10.04	86.93±26.87	32.00±46.38	90.08±14.38	7.54±20.48
p-Valor^a	0.331	0.335	0.007	0.044	0.282	0.607
Histórico de Fumo						
Yes (n=4)	18.00±23.81	98.25±2.06	90.00±7.70	37.00±47.71	93.25±8.62	0.00±0.00
No (n=17)	10.58±8.82	93.70±14.88	66.18±44.91	17.65±39.30	92.19±13.93	12.38±29.80
p-Valor^a	0.370	0.558	0.313	0.403	0.887	0.426
Consumo de Álcool						
Yes (n=8)	16.33±16.82	94.38±13.18	78.38±31.14	31.00±45.69	91.86±11.84	0.00±0.00
No (n=13)	9.22±8.09	94.86±14.00	66.00±47.20	15.38±37.55	92.69±13.82	15.23±32.60
p-Valor^a	0.289	0.940	0.520	0.404	0.894	0.238
cT						
T1/2 (n=9)	10.00±7.38	98.00±2.20	59.44±46.44	16.44±35.13	91.33±15.63	19.00±38.39
T3/4 (n=12)	13.44±15.03	91.50±18.04	77.27±38.15	27.27±46.71	92.60±11.13	2.70±8.54
p-Valor^a	0.614	0.329	0.358	0.573	0.840	0.207
cN						
N0 (n=6)	5.50±6.35	100.00±0.00	71.60±43.96	60.00±54.77	97.40±5.81	0.00±0.00
N+ (n=15)	13.30±13.41	95.15±12.81	66.21±43.45	10.57±28.74	91.62±13.87	15.23±32.60
p-Valor^a	0.295	0.471	0.815	0.019	0.387	0.321

*p<0.05 versus outros grupos; ^ateste de Mann-Whitney; p<0.05 (média ±DP).

Tabela 4: Associação de aspectos clínico-patológicos, imunexpressão de receptores de opioides, Ki67 e Caspase-3 com as taxas de sobrevivência em CECOs p16 + e p16-.

	p16-				p16+			
	10-anos SG	Média±EP (CI95%)	Mediana	p-Valor	10-anos SG	Média±EP (CI95%)	Mediana	p-Valor
Toda Amostra	18 (56.3%)	57.53±8.43 (41.00-74.05)	62	-	12 (57.1%)	75.92±11.14 (54.08-97.76)	-	-
Sexo								
Masculino	12 (50.0%)	46.37±8.52 (29.67-63.06)	45	0.225	7 (50.0%)	66.02±13.12 (40.31-91.73)	33	0.325
Feminino	6 (75.0%)	75.57±15.80 (44.60-106.54)	.		5 (71.4%)	92.00±17.12 (58.44-125.56)	.	
Idade								
≤60	6 (85.7%)	82.29±10.85 (61.03-103.54)	.	0.151	5 (71.4%)	92.29±16.69 (59.58-124.99)	.	0.308
>60	12 (48.0%)	51.31±9.17 (33.33-69.29)	45		7 (50.0%)	57.79±11.32 (35.60-79.97)	40	
Histórico Familiar de Câncer								
Sim	5 (62.5%)	47.00±11.00 (25.45-68.55)	62	0.890	4 (57.1%)	65.14±11.49 (42.62-87.66)	.	0.710
Não	13 (54.2%)	57.26±9.59 (38.47-76.05)	45		8 (57.1%)	74.50±14.11 (46.84-102.16)	.	
Histórico de Fumo								
Sim	4 (44.4%)	41.63±14.64 (12.94-70.33)	21	0.299	2 (50.0%)	57.75±20.28 (17.99-97.51)	33	0.757
Não	14 (60.9%)	58.81±10.24 (38.74-78.89)	62		10 (58.8%)	77.66±12.29 (53.57-101.75)	.	
Consumo de Álcool								
Sim	3 (42.9%)	33.86±11.40 (11.52-56.19)	21	0.387	4 (50.0%)	55.38±14.63 (26.70-84.05)	33	0.495
Não	15 (60.0%)	59.57±9.53 (40.89-78.26)	62		8 (61.5%)	81.85±13.54 (55.31-108.38)	.	
cT								
T1/2	7 (53.8%)	53.10±11.42 (30.73-75.48)	45	0.769	5 (55.6%)	74.44±17.27 (40.60-108.29)	.	0.729
T3/4	11 (64.7%)	66.26±11.58 (43.57-88.95)	.		7 (63.6%)	79.21±14.26 (51.27-107.15)	.	

	p16-				p16+			
	10-anos SG	Média±EP (CI95%)	Mediana	p-Valor	10-anos SG	Média±EP (CI95%)	Mediana	p-Valor
Toda Amostra	18 (56.3%)	57.53±8.43 (41.00-74.05)	62	-	12 (57.1%)	75.92±11.14 (54.08-97.76)	-	-
cN								
N0	5 (50.0%)	53.82±14.18 (26.02-81.62)	45	0.477	4 (80.0%)	75.00±14.31 (46.95-103.05)	.	0.430
N+	11 (68.8%)	63.58±10.52 (42.95-84.20)	.		8 (57.1%)	75.53±13.75 (48.58-102.48)	.	
Ki67								
Até 10%	3 (30.0%)	33.40±9.29 (15.20-51.60)	21	0,495	5 (55.6%)	69.11±17.10 (35.60-102.62)	.	0,640
>10%	6 (54.5%)	53.13±12.79 (28.05-78.21)	62		4(66.7%)	85.38±19.61(46.94-123.81)	.	
Caspase-3								
<100%	8 (72.7%)	68.52±11.80 (45.39-91.64)	.	0,037	2 (28.6%)	38.86±14.17 (11.08-66.64)	21	0,069
100%	4 (26.7%)	30.54±8.61 (13.66-47.42)	21		8 (66.7%)	85.48±13.96 (58.11-112.85)	.	
Mu citoplasma								
<100%	7 (58.3%)	59.67±11.72 (36.70-82.64)	62	0,406	6 (60.0%)	66.97±11.56 (44.30-89.64)	.	0,638
100%	6 (46.2%)	34.98±5.49 (24.22-45.75)	45		6 (54.5%)	71.82±16.01 (40.44-103.20)	.	
Mu núcleo								
0%	7 (50.0%)	44.05±6.80 (30.72-57.38)	47	0,897	9 (56.3%)	76.46±12.36 (52.22-100.69)	.	0,862
>0%	6 (54.5%)	53.77±12.82 (28.64-78.89)	26		3 (60.0%)	61.20±19.63 (22.72-99.68)	.	
Kappa citoplasma								
<100%	6 (54.5%)	42.21±9.01 (24.55-59.88)	62	0,812	5 (62.5%)	79.00±18.78 (42.19-115.81)	.	0,999
100%	6 (37.5%)	48.11±10.26 (27.99-68.22)	26		7 (58.3%)	75.11±13.47 (48.70-101.52)	.	
Kappa núcleo								
0%	10 (41.7%)	43.13±7.87 (27.70-58.55)	45	0,290	10 (58.8%)	74.34±11.85 (51.12-97.56)	.	0,625
>0%	2(66.7%)	72.33±24.22(24.86-119.81)	.		2(66.7%)	93.33±21.77(50.66-136.01)	.	

*p<0.05. Log-Rank Mantel Cox; EP = erro padrão; IC95% = intervalo de confiança 95% da média de sobrevida; SG = sobrevida global.

Tabela 5: Preditores de sobrevida global de pacientes com CECOs p16- e p16 + de acordo com o modelo de regressão logística multinomial.

	p-Valor	HR Ajustada (IC95%)
OS p16-		
Ki67	0.099	0.67 (0.42-1.08)
Caspase-3	0.277	0.90 (0.74-1.09)
Mu citoplasma	0.118	1.13 (0.97-1.31)
Mu núcleo	*0.048	0.84 (0.71-1.00)
Kappa citoplasma	0.073	0.74 (0.54-1.03)
Kappa núcleo	*0.046	1.20 (1.00-1.45)
p16+		
Ki67	0.285	3.42 (0.36-32.60)
Caspase-3	0.371	1.36 (0.69-2.67)
Mu citoplasma	0.602	0.79 (0.33-1.90)
Mu núcleo	0.331	1.49 (0.67-3.30)
Kappa citoplasma	0.240	0.33 (0.05-2.12)
Kappa núcleo	0.721	1.17 (0.50-2.76)

* p <0,05. Regressão de Cox. HR = risco de morte; CI = intervalo de confiança. HR e IC estimados pelo modelo de regressão de risco proporcional de Cox.

4. CONCLUSÃO GERAL

- De maneira geral, foi possível observar que há imunexpressão de receptores opioides em mucosa oral, com aumento em LPM, CCE de boca e orofaringe.
- Essa imunexpressão pode estar localizada em citoplasma ou núcleo, apesar de não se conseguir entender quais as funções de cada uma dessas localizações.
- Nos carcinomas de boca, a imunexpressão de RMO foi diretamente associada ao Ki67, e observou-se também que tumores menores expressam menos RMO, o que indica que esse receptor, em cavidade oral, pode estar relacionado com a proliferação celular.
- Ainda nos carcinomas de boca, RKO em citoplasma influenciou negativamente a sobrevida dos pacientes, sendo um marcador a ser estudado mais profundamente como marcador de prognóstico.
- Em orofaringe, especificamente, os tumores p16- são mais fortemente influenciados por esses receptores, sugerindo que a supressão da via dos receptores opioides causada pelo HPV contribui de certa forma para um bom prognóstico. Observou-se RKO nuclear como fator de risco para morte.
- Estudos prospectivos são necessários para compreender como a ativação desses receptores pode influenciar no prognóstico e quais mecanismos podem levar ao aumento da imunexpressão destes.

5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABDELHAKAM, D. A.; HUENERBERG, K. A.; NASSAR, A. Utility of p16 and HPV testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: an institutional review. **Diagnostic Cytopathology**, v. 49, n. 1, p. 54-59, 2021.

AFSHARIMANI, B.; CABOT, P.; PARAT, M.O. Morphine and tumor growth and metastasis. **Cancer metastasis reviews**, v. 30, n. 2 p. 225-38, 2011.

APOLONE, G. et al. Pattern and quality of care of cancer pain management. Results from the Cancer Pain Outcome Research Study Group. **British Journal of Cancer**, v. 100. p. 1566-74, 2009.

BARBERA, L. C. et al. How often are opioids prescribed for cancer patients reporting pain? Results of a population-based analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 6084-6084, 2011.

BENNETT, M. I. et al. Standards for the management of cancer-related pain across Europe—A position paper from the EFIC Task Force on Cancer Pain. **European journal of pain**, v. 23, n. 4, p. 660-668, 2019.

BIGLIARDI-QI, M. et al. Mu-opiate receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. **Dermatology**, v. 209, n.3, p. 183-189, 2004.

BJERKLI, INGER-HEIDI et al. Characteristics and prognosis of primary treatment-naive oral cavity squamous cell carcinoma in Norway, a descriptive retrospective study. **PLoS one**, v. 15, n. 1, p. e0227738, 2020.

BRASIL, Câncer, INCA, Silva, JAG. Estimativa 2018, Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, Inca. p.118, 2020.

BRINKMAN, B.M., WONG, D.T. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 18, n. 3, p. 228-233, 2006.

CHARBAJI, N., SCHÄFER-KORTING, M., & KÜCHLER, S. Morphine stimulates cell migration of oral epithelial cells by delta-opioid receptor activation. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42616, 2012.

CHEN, C.; FAROOQUI, M.; GUPTA, K. Morphine stimulates vascular endothelial growth factor-like signaling in mouse retinal endothelial cells. **Current Neurovascular Research**. v. 3, n. 3, p.171-80, 2006.

CHEN, M.F. et al. Role of interleukin 1 beta in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Molecular Medicine**, Taiwan, v. 90, n.1, p. 89-100, 2012.

- DANCYGER, A. et al. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 4, p. e12343, 2018.
- DANTAS TS. et al. Influence of educational level, stage, and histological type on survival of oral cancer in a Brazilian population: a retrospective study of 10 years observation. **Medicine**, v. 95, n.3, 2016.
- DE OLIVEIRA FILHO, O. V. et al. Mismatch Repair Proteins in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Observational Study. **Head and Neck Pathology**, p. 1-14, 2021.
- FAROOQUI, M. et al. Naloxone acts as an antagonist of estrogen receptor activity in MCF-7 cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.5, n. 3, p. 611-20, 2006.
- FINLEY, M. J. et al. Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. **Cellular immunology**, v. 252, n. 1-2, p. 146-154, 2008.
- FONSECA, A. L. A. et al. Involvement of repair genes in oral cancer: A systematic review. **Cell biochemistry and function**, v. 37, n. 8, p. 572-577, 2019.
- FUJIOKA, N. et al. Morphine-induced epidermal growth factor pathway activation in non-small cell lung cancer. **Anesthesia and analgesia**, v. 113, n. 6, p. 1353, 2011.
- GACH, K. et al. The role of morphine in regulation of cancer cell growth. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 384, n. 3, p. 221-230, 2011.
- GOZZANI, J.L. Opioides e antagonistas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 44, n. 1, p.65-73, 1994.
- GUIDA, A. et al. Oral lichen planus and other confounding factors in narrow band imaging (NBI) during routine inspection of oral cavity for early detection of oral squamous cell carcinoma: a retrospective pilot study. **BMC oral health**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.
- GUPTA, K. et al. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. **Annals of Cancer Research**. v. 62, n. 15, p.4491-4498, 2002.
- IGLESIAS, M. et al. Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 4, p.482-492, 2003.
- JADOTTE, Y.T., SCHWARTZ, R.A. Solar cheilosis: An ominous precursor: Part I. Diagnostic insights. **Journal American of Academy of Dermatology**, v.66, n.2, p. 173-184, 2012.
- JANAH, A. et al. Opioid analgesics prescription in people with and without cancer in France. **Journal of opioid management**, v. 14, n. 4, p. 245-256, 2018.

JANAH, A. et al. Opioid analgesics prescription in people with and without cancer in France. **Journal of opioid management**, v. 14, n. 4, p. 245-256, 2018.

KASAI, S. et al. Pharmacogenomics of the human μ -opioid receptor. **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 9, p. 1305-1320, 2011.

KOODIE, L.; RAMAKRISHNAN, S.; ROY, S. Morphine suppresses tumor angiogenesis through a HIF-1 α /p38MAPK pathway. **American journal of speech-language pathology / American Speech-Language-Hearing Association**, v. 177, n. 2, p. 984-997, 2010.

KUPCZYK, P. et al. Opioid receptors in psoriatic skin: relationship with itch. **Acta dermato-venereologica**, v. 97, n.5, p.564-570, 2017.

LEEMANS, C. R.; SNIJDERS, P. J. F; BRAKENHOFF, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 5, p. 269-282, 2018.

LENNON, F. E. et al. The Mu opioid receptor promotes opioid and growth factor-induced proliferation, migration and Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in human lung cancer. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91577, 2014.

LENNON, Frances E. et al. Overexpression of the μ -opioid receptor in human non-small cell lung cancer promotes Akt and mTOR activation, tumor growth, and metastasis. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 116, n. 4, p. 857-867, 2012.

LYDIATT, W.M. Head and Neck Cancers—Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 2, p. 122-137, 2017.

MACHIELS, J.-P. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 11, p. 1462-1475, 2020.

MARTIN, W.R. Pharmacology of opioids. **Pharmacology Ver.** v.35, n. 4, p.283-303, 1983.

MATHEW, B. et al. Novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory study. **Anesthesia and analgesia**, v. 112, n. 3, p. 558, 2011.

MORO, J. S. et al. Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 16, 2018.

MOSS, J.; ROSOW, C.E. Development of peripheral opioid antagonists' new insights into opioid effects. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 83, p.1116-1130, 2008.

NGUYEN, J. et al. Morphine stimulates cancer progression and mast cell activation and impairs survival in transgenic mice with breast cancer. **British journal of anaesthesia**, v. 113, n.1, p. i4-i13, 2014.

PANARESE, I. et al. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. **Expert review of anticancer therapy**, v. 19, n. 2, p. 105-119, 2019.

PANARESE, I. et al. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. **Expert review of anticancer therapy**, v. 19, n. 2, p. 105-119, 2019.

PETERSEN, P.E. Oral cancer prevention and control—the approach of the World Health Organization. **Oral oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 454-460, 2009.

PLEIN, L. M.; RITTNER, H. L. Opioids and the immune system—friend or foe. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 14, p. 2717-2725, 2018.

RIVERA, C. et al. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. **Int J Clin Exp Pathol**, v.7, n.9, p.5968-5977, 2014.

SCHREIBER, R., BARTOSZYK, G. D., & KUNZELMANN, K. The κ -opioid receptor agonist asimadoline inhibits epithelial transport in mouse trachea and colon. **European journal of pharmacology**, v. 503, p.1-3, 2004.

SIGLEY, J. et al. Diffusion and binding of mismatch repair protein, MSH2, in breast cancer cells at different stages of neoplastic transformation. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170414, 2017.

SINGLETON, P.A. et al. Methylnaltrexone inhibits opiate and VEGF-induced angiogenesis: role of receptor transactivation. **Microvascular Research**, v.72, n. 1-2, p.3-11, 2006.

SINGLETON, P.A.; MOSS J. Effect of perioperative opioids on cancer recurrence: a hypothesis. **Future Oncology**, v. 6, n. 8, p.1237–1242, 2010.

SINGLETON, Patrick A. et al. The mu opioid receptor: A new target for cancer therapy?. **Cancer**, v. 121, n. 16, p. 2681-2688, 2015

SOUZA, L; et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. **Medicina Oral, Patologia Oral e Cirurgia Bucal**, v. 16, n. 6, p. 757-62, 2011.

SUZUKI, M. et al. Sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied by changes in the expression of substance P and μ -opioid receptors in the spinal cord of mice. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 117, n. 4, p. 847-856, 2012.

TANEDA, K. et al. Evaluation of epidermal nerve density and opioid receptor levels in psoriatic itch. **British Journal of Dermatology**, v.165, n.2, p.277-284, 2001.

TEGEDER, I. et al. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. **Cancer Research**, v. 15, n. 63, p.1846-1852, 2003.

THOMSON, P. J. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 9, p. 803-807, 2018.

VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, M. H. J. et al. Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. **Annals of oncology**, v. 18, n. 9, p. 1437-1449, 2007.

WANG, Y.F et al. Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v.24, p.9, n.850-858, 2002.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009.

YEAGER, M.P, COLACCHIO T.A. Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. **Arch Surgery**, V. 126, n. 4, p. 454-456, 1991.

ZAGON, I.S.; MCLAUGHLIN, P.J. Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. **Science**, v. 221, n. 4611, p. 671-673, 1983.

ZHANG, H. et al. Increased mu-opioid receptor expression is associated with reduced disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma. **British journal of anaesthesia**, v. 125, n. 5, p. 722-729, 2020.

ZHANG, Y. F. et al. Association of mu-opioid receptor expression with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus*, v.28, n. 2), p.196-203, 2015.

ZHANG, Y. F. et al. κ -Opioid receptor in the nucleus is a novel prognostic factor of esophageal squamous cell carcinoma. *Human pathology*, v. 44, n. 9, p.1756-1765, 2013.

ZINI, A., CZERNINSKI, R., SGAN-COHEN, H.D. Oral cancer over four decades: Epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n.4, p. 299-305, 2010.

ZYLLA, D. et al. Opioid requirement, opioid receptor expression, and clinical outcomes in patients with advanced prostate cancer. **Câncer**, v.119, p.4103-4110, 2013.

ANEXO 1

Comitê de Ética em Pesquisa - UFC

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES EM EPITÉLIO DE MUCOSA ORAL, DISPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS

Pesquisador: Thinali Sousa Dantas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06530818.7.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 21 de Março de 2019

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO 2

Comitê de Ética em Pesquisa - ICC

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES, VIAS INFLAMATÓRIAS E MARCADORES DE ANGIOGÊNESE NO CÂNCER DE BOCA E DE OROFARINGE

Pesquisador: Thinali Sousa Dantas

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51871315.4.3001.5528

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.618.057

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 01 de Julho de 2016

Assinado por:

**Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)**

Endereço: PAPI JUNIOR

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.441-700

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

ANEXO 3

Author Guidelines – Oral Disease

Oral Diseases now offers [Free Format submission](#) for a simplified and streamlined submission process; [More details here](#)

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

Relevant Documents: [Open Access Order Form](#), [Standard Release Form for photographic consent](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles Published in Oral Diseases](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

1. GENERAL

The editors encourage submissions of original articles, review articles, reports of meetings, book reviews and correspondence in the form of letters to the editor. *Oral Diseases* does not accept case reports.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Oral Diseases*. Authors are encouraged to visit [Wiley Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

PreprintPolicy

Please find the Wiley preprint policy [here](#). *Oral Diseases* accepts articles previously published on preprint servers. *Oral Diseases* will consider for review articles previously available as preprints. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article. Authors may also post the final published version of the article immediately after publication.

Data Sharing and Data Accessibility

Oral Diseases expects data sharing. All accepted manuscripts will need to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. The journal

expects authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. [Sample statements are available here](#). If published, statements will be placed in the heading of your manuscript.

2. ETHICAL GUIDELINES

Oral Diseases adheres to the ethical guidelines given below for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authorship: *Oral Diseases* adheres to the [International Standards for Authors](#) published by the Committee on Publication Ethics (COPE). All authors named on a paper should agree to be named on the paper, and all authors so named should agree to the submission of the paper to *Oral Diseases* and approve the submitted and accepted versions of the publication. Any change to the author list should be approved by all authors, including any author who has been removed from the list.

Oral Diseases also adheres to the [definition of authorship](#) set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that the corresponding author submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors should also be registered with a correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are incorrect, the corresponding author will be contacted by the Journal Administrator.

For all articles, the journal mandates the CRediT (Contribution Roles Taxonomy), for more information please see [Author Services](#).

Acknowledgements: Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research. Authors must acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials). If/how this assistance was funded should be described and included with other funding information. “Acknowledgements” should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a cover letter demonstrating their consent must be provided.

2.2. Ethical Approvals

Human Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

Photographs of People: Oral Diseases follows current HIPAA guidelines for the protection of patient/subject privacy. If an individual pictured in a digital image or photograph can be identified, his or her permission is required to publish the image. The corresponding author must either submit a letter signed by the patient authorizing Oral Diseases to publish the image/photo, or complete the 'Standard Release Form for photographic consent' available at the top of this page or by clicking the “instructions and Forms” link on the ScholarOne Manuscripts submission site. The approval must be received by the Editorial Office prior to final acceptance of the manuscript for publication. Otherwise, the image/photo must be altered such that the individual cannot be identified (black bars over eyes, tattoos, scars, etc.). Oral Diseases will not publish patient photographs that will in any way allow the patient to be identified, unless the patient has given their express consent.

Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

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

2.3 Clinical Trials

Clinical Trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) and [flowchart](#) should also be included in the submission material. Clinical trials can be registered in any free, public clinical trials registry such as <http://www.clinicaltrials.gov> or <http://isrctn.org/>. A list of further registries is available at <http://www.who.int/ictrp/network/primary/en/>. As stated in an editorial published in *Oral Diseases* (**12:217-218**), 2006), all manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website. The clinical trial registration number and name of the trial register will be published with the paper.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Authors are also required to disclose any possible conflict of interest. These include financial (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee). Information on sources of funding and any potential conflict of interest should be disclosed at submission under the heading "Acknowledgements".

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7 Avoiding allegations of plagiarism

The journal to which you are submitting your manuscript employs text matching software (iThenticate) to ensure against plagiarism. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published work. Authors should consider whether their manuscript may raise concerns via iThenticate, which will signal whether a paper is likely in any way to be plagiarized in a formal sense. iThenticate will also, however, signal whether a paper may be plagiarized by repeating work of the submitting authors and thus be regarded as duplicate or redundant publication. Experience shows that, on occasion, large sections of submitted manuscripts can be close to verbatim in word choice from that seen in other papers from the authors' group. This has nothing to do with simple repetition of names/affiliations, but does involve common (not necessarily "standard") phrases that are more appropriately referenced instead of repeating. Alternatively, they can be rephrased differently. Previously published results, including numerical information and figures or images, should be labeled to make it clear where they were previously reported. Papers that present new analyses of results that have already been published (for example, subgroup analyses) should identify the primary data source, and include a full reference to the related primary publications. *Oral Diseases* will review and publish accepted manuscripts that report data included in conference proceedings in abstract form. In such cases, authors must be clear to readers that part of all of the manuscript's data have already been published in abstract form by so indicating using a footnote to the title that states the conference proceedings in which the relevant abstract was published. For full guidance on text matching and plagiarism, please refer to Section 3 ('Research Integrity') of Wiley's Ethics Guidelines at <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>.

2.8 Permissions

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

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Oral Diseases only accepts online submission of manuscripts. Manuscripts should be submitted at the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/odi>. Complete instructions for submitting a manuscript are available at the site upon creating an account. Assistance for submitting papers can be sought with the editorial assistant

at: odiedoffice@wiley.com

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>.

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.

3.1. Manuscript Files Accepted

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

3.2. Transparent Peer Review

This journal is participating in a Peer Review Transparency initiative. 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. Read more about this initiative [here](#).

3.3. Suggest a Reviewer

Oral Diseases attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, you must suggest the names and current e-mail addresses of from 2-4 potential reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript in an unbiased way.

3.4. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

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

3.5. E-mail Confirmation of Submission

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

3.6. Manuscript Status

The average time from submission to first decision for manuscripts submitted to *Oral Diseases* is 20 days. You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.7. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: Manuscripts reporting laboratory investigations, well-designed and controlled clinical research, and analytical epidemiology are invited. Studies related to aetiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment are all of interest, but all papers must be based on rigorous hypothesis-driven research. Areas of interest include diseases affecting any structures of the mouth; cancer and pre-cancerous conditions; saliva and salivary glands; bone and hard tissues; relationship between oral, periodontal, and dental conditions and general health; pain; behavioral dentistry; chemosensory, developmental, geriatric, and motor disorders.

Randomised trials must adhere to the [CONSORT guidelines](#), and a [CONSORT checklist](#) and [flowchart](#) must be submitted with such papers. Please also refer to the notes under section 2.3 above. Oral Diseases supports the ALLTRIALS initiative and encourages authors submitting manuscripts reporting a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

Observational studies must adhere to the [STROBE guidelines](#), and a [STROBE checklist](#) must be submitted with such papers. Diagnostic accuracy studies must adhere to the [STARD guidelines](#), and a [STARD checklist](#) must be submitted with such papers.

Review Papers: *Oral Diseases* commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Systematic reviews with or without meta-analyses must adhere to the [PRISMA guidelines](#), and a [PRISMA checklist](#) and [flowchart](#) must be submitted with such papers. The word limit for Review Papers is 4,000 words, with a maximum of two tables or images and 50 references.

Letters to the Editors: Letters, if of broad interest, are encouraged. They may deal with material in papers published in *Oral Diseases* or they may raise new issues, but should have important implications. Only one letter may be submitted by any single author or group of authors on any one published paper. Letters to the Editors should not include an abstract and are limited to 500 words, with a maximum of 1 figure and 10 references.

Case Reports: *Oral Diseases* does not accept case reports and instead recommends that authors submit to [Clinical Case Reports](#) an open access journal published by Wiley.

Meeting Reports: Will be considered by the editors for publication only if they are of wide and significant interest.

Short Communications: These are brief papers of any topic within the scope of *Oral Diseases* about significant and novel advances that are complete in research endeavor but not suitable for full publications. Short Communications should not include an abstract and are limited to 1000 words, with a maximum of 3 figures and 20 references. Short Communications **should not** be structured into sections.

Invited Reviews: These may be submitted by invitation of the Senior Editors only, and consist of around 2500-2750 words, with a maximum of one table or image and 25 references.

Commentaries: These may be submitted by invitation of the Senior Editors only.

Invited Editorials: These may be submitted by invitation of the Senior Editors only.

Invited Book Reviews: These may be submitted by invitation of the Senior Editors only.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Oral Diseases 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

If you are invited to revise your manuscript after peer review, the journal will also request the revised manuscript to be formatted according to journal requirements as described below.

5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages, including title page, abstract, references, table/figure legends and tables and figures, are subject to a charge of GBP70 per additional page. As a guide, one published page amounts approximately to 850 words, or two to four small tables/figures. Additional supplementary material (including text and figures), which does not fit within the page limits, can be published online only as supporting information.

5.2. Format

Language: Authors should write their manuscripts in British English using an easily readable style. Authors whose native language is not English should have a native English speaker read and correct their manuscript. Spelling and phraseology should conform to standard British usage and should be consistent throughout the paper. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. The background and hypotheses underlying the study as well as its main conclusions should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Technical jargon: should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations: *Oral Diseases* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.3. Structure: All papers submitted to *Oral Diseases* should include:

- Title Page
- Structured Abstract
- Main text
- References
- (Figures)
- (Figure Legends)
- (Tables)

Title Page: should be part of the manuscript uploaded for review and include:

- A title of no more than 100 characters including spaces

- A running title of no more than 50 characters
- 3-6 keywords
- Complete names and institutions for each author
- Corresponding author's name, address, email address and fax number
- Date of submission (and revision/resubmission)

Abstract: is limited to 200 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form set out under:

- Objective(s),
- Subject(s) (or Materials) and Methods,
- Results,
- Conclusions(s).

The Main Text of Original Research Articles should be organised as follows

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

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 includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: As noted above, these should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A **CONSORT checklist** should also be included in the submission material. Clinical trials can be registered in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. As stated in an editorial published in *Oral Diseases* (12:217-218), 2006), all

manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website. The clinical trial registration number and name of the trial register will be published with the paper.

(ii) Experimental subjects: As noted above, experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

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

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Acknowledgements: Should be used to provide information on sources of funding for the research, any potential conflict of interest and to acknowledge contributors to the study that do not qualify as authors. All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully

acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a cover letter demonstrating their consent must be provided.

5.4. References

References should be prepared according to the *Publication Manual of the American Psychological Association* (6th edition). This means in-text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). For references with three to five authors, all authors should be listed only on the first occurrence of the in-text citation, and in subsequent in-text occurrences only the first author should be listed followed by '*et al.*'. The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA website](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Example of reference with 2 to 7 authors

Beers, S. R., & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. doi: 10.1176/appi.ajp.159.3.483

Ramus, F., Rosen, S., Dakin, S. C., Day, B. L., Castellote, J. M., White, S., & Frith, U. (2003). Theories of developmental dyslexia: Insights from a multiple case study of dyslexic adults. *Brain*, 126(4), 841–865. doi: 10.1093/brain/awg076

Example of reference with more than 7 authors

Rutter, M., Caspi, A., Fergusson, D., Horwood, L. J., Goodman, R., Maughan, B., ... Carroll, J. (2004). Sex differences in developmental reading disability: New findings from 4 epidemiological studies. *Journal of the American Medical Association*, 291(16), 2007–2012. doi: 10.1001/jama.291.16.2007

Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Figures: All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF).

Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).

Color figures

Color figures may be published online free of charge; however, the journal charges for publishing figures in colour in print. If the author supplies colour figures at Early View publication, they will be invited to complete a colour charge agreement in RightsLink for Author Services. The author will have the option of paying immediately with a credit or debit card, or they can request an invoice. If the author chooses not to purchase color printing, the figures will be converted to black and white for the print issue of the journal.

Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).

6. AFTER ACCEPTANCE

Wiley Author Services

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. You will be asked to sign a publication license at this point as well as pay for any applicable APCs.

Copyright & Licensing

You 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. Standard re-use and licensing rights vary by journal. Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND Creative Commons License.

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.

Proof Corrections

Proofs must be returned to the Production Editor within **three days** of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

Early View

Oral Diseases is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed

issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

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.

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.