



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

LÍVIA NATÁLIA SALES BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE POR
MEIO DA GALECTINA-1 EM CISTOS ODONTOGÊNICOS DE ORIGEM
INFLAMATÓRIA E DE DESENVOLVIMENTO**

Recife

2021

LÍVIA NATÁLIA SALES BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE POR
MEIO DA GALECTINA-1 EM CISTOS ODONTOGÊNICOS DE ORIGEM
INFLAMATÓRIA E DE DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada.

Orientador (a): Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Coorientador (a): Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

B862a Brito, Livia Natália Sales de.
Avaliação imunoistoquímica da via extrínseca da apoptose por meio da Galectina-1 em cistos odontogênicos de origem inflamatória e de desenvolvimento / Livia Natália Sales de Brito. – 2021.
106 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientador : Gustavo Pina Godoy.
Coorientador : Cassiano Francisco Weege Nonaka.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Imuno-Histoquímica. 2. Galectinas. 3. Cisto Radicular. 4. Cistos Maxilomandibulares. 5. Apoptose. I. Godoy, Gustavo Pina (Orientador). II. Nonaka, Cassiano Francisco Weege (Coorientador). III. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2022-264)

LÍVIA NATÁLIA SALES BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE POR
MEIO DA GALECTINA-1 EM CISTOS ODONTOGÊNICOS DE ORIGEM
INFLAMATÓRIA E DE DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada

Aprovado em: 29/06/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Jurema Freire Lisboa de Castro (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Éricka Janine Dantas da Silveira (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof.^a Dr.^a Bárbara Vanessa de Brito Monteiro (Examinador Externo)
Universidade Federal de Campina Grande

Prof.^a Dr.^a Hellen Bandeira de Pontes Santos (Examinador Externo)
FAMENE

Prof.^a Dr.^a Pollianna Muniz Alves (Examinador Externo)
Universidade Estadual da Paraíba

A **Deus**, acima de tudo, minha fortaleza durante toda a caminhada.

Aos meus pais **Brito** e **Fátima**, por todo o amor, suporte, torcida e compreensão.
Vocês são meus amores e essa conquista é nossa!

Aos meus irmãos **Lhincio** e **Laísa** e à minha cunhada **Maiara** que sempre torceram pelo meu sucesso.

À **Lucas** que tanto apoiou e incentivou a busca pelos meus objetivos e compreendeu minhas ausências, sem perder o bom humor.

À **Maria Luiza**, que ilumina meus dias com seu sorriso e ao pequeno **Matheus**, que chegou nesse mundo renovando a esperança de que dias melhores estão por vir...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy**. Sua confiança no meu trabalho e seu compromisso com uma educação transformadora me incentivaram a conquistar meus objetivos. Seus conselhos e ensinamentos me fizeram crescer, suas palavras de apoio me consolaram nos momentos de angústia e seu amor pelo ensino é uma inspiração para minha vida.

Que Deus o abençoe! Muito obrigada!!!

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**. Minha gratidão por todo apoio e dedicação ao desenvolvimento dessa pesquisa, que mesmo nos momentos mais difíceis, conseguia motivar e buscar soluções para as adversidades.

Obrigada pela gentileza, conselhos e paciência ao me ensinar.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, **Profa. Dra. Alessandra De Albuquerque Tavares Carvalho, Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes, Profa. Dra. Andrea Cruz Câmara, Profa. Dra. Andrea Dos Anjos Pontual, Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Prof. Dr. Arnaldo De França Caldas Junior, Profa. Dra. Bruna De Carvalho Farias Vajgel, Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar, Prof. Dr. Danyel Elias Da Cruz Perez, Profa. Dra. Elaine Judite de Amorim Carvalho, Profa. Dra. Flavia Maria De Moraes Ramos Perez, Prof. Dr. Hilton Justino da Silva, Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, Profa. Dra. Juliana Raposo Souto Maior, Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa De Castro, Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros, Profa. Dra. Maria Luiza Dos Anjos Pontual e a Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira**, pelas contribuições para o meu crescimento intelectual.

Aos meus amigos e familiares que acompanharam esse período, que compreenderam as ausências e que tinham sempre uma palavra de incentivo.

Ao meu grupo de pesquisa e colegas de pós-graduação por todo apoio, auxílios prestados, risadas compartilhadas e angústias divididas.

Em especial, meu agradecimento à **Augusto César, Maria Izabel e Sérgio Carvalho**.

À **Thayanara Silva Melo**, que tanto me apoiou, auxiliou e torceu para a finalização dessa etapa. Que sorte a minha de tê-la conhecido e compartilhado tantas experiências!

Aos meus companheiros de estrada **Thayana** e **Arley**, foram muitos quilômetros de conversas, risadas e aventuras. Vocês são presentes de Deus na minha vida!!!

Às colegas de laboratório **Christany** e **Catarina** quero deixar minha gratidão por todo o auxílio na rotina laboratorial, torcida e apoio.

Às queridas **Ana Luzia** e **Denize**, sempre solícitas e amáveis ao me auxiliarem.

Um agradecimento especial ao **Seu Rogério** (*in memorian*), pelo auxílio no Laboratório de Patologia Oral da UFPE.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte** (UFRN) e à **Universidade de Fortaleza** (UNIFOR) pelas contribuições para a realização desse trabalho.

À **Universidade Estadual da Paraíba** (UEPB). Agradeço todo apoio fornecido para o desenvolvimento desta pesquisa. Tenho muito orgulho por ter feito parte dessa instituição e de tudo que ela representa para o ensino e pesquisa científica.

À **Universidade Federal de Pernambuco** (UFPE) pelas contribuições para o desenvolvimento da minha formação acadêmica

À **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

O crescimento dos cistos odontogênicos depende do equilíbrio entre proliferação e morte celular. Diversos mediadores e citocinas estão envolvidos no desenvolvimento destas lesões, todavia seus papéis não foram completamente elucidados. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a expressão imunoistoquímica da galectina-1 e de marcadores da via extrínseca da apoptose (Bax, Bcl-2 e caspase -3) em cistos radiculares (CR) e ceratocistos odontogênicos (CO), relacionando os achados com os parâmetros histopatológicos de intensidade do infiltrado inflamatório e padrão de revestimento epitelial nos CR e local de imunoexpressão nos CR e CO. O estudo foi caracterizado como observacional, descritivo e retrospectivo. A amostra foi composta por vinte CR e 20 casos de CO. A análise da expressão imunoistoquímica das proteínas investigadas foi realizada quantitativamente, mediante a análise de 10 campos microscópicos com maior imunorreatividade, e a estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 foram submetidos à estatística. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise morfológica do revestimento epitelial dos CR revelou 12 casos (60,0%) com padrão epitelial hiperplásico e 8 casos (40,0%), padrão atrófico. Já o infiltrado inflamatório revelou 12 casos (60,0%) com infiltrado inflamatório grau III, 6 casos (30,0%) grau II e apenas 2 casos (10,0%) com grau I. No revestimento epitelial dos CR, as maiores imunoexpressões de galectina-1 (citoplasmática/membranar) e caspase-3 foram na região parabasal/superficial, Bcl2 na camada basal/parabasal e Bax em todas as camadas. Os CO apresentaram maiores diferenças estatísticas de imunoexpressão para galectina-1 (citoplasmática/membranar), Bcl-2 e Bax na camada basal/parabasal. A expressão de nuclear galectina-1 foi evidenciada em 1 caso de CR e a caspase-3 em apenas 3 casos de CO. Associações estatísticas foram identificadas na imunoexpressão de Bcl-2 no epitélio e cápsula fibrosa de CR e CO, expressão de Bax no epitélio de CR e CO e na expressão nuclear de galectina-1 e caspase-3 na cápsula fibrosa de CR, em relação ao infiltrado inflamatório ($p < 0,05$). A apoptose interfere de diferentes formas nos CR e CO e a galectina-1 participa na regulação dos mecanismos imunoinflamatórios de CR.

Palavras-chave: imuno-histoquímica; galectinas; cisto radicular; cistos maxilomandibulares; apoptose.

ABSTRACT

The growth of odontogenic cysts depends on the balance between death and cell proliferation. Several mediators and cytokines are involved in the development of these lesions, however their roles have not been fully elucidated. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of galectin-1 and extrinsic apoptosis pathway markers (Bax, Bcl-2 and caspase-3) in radicular cysts (RC) and odontogenic keratocysts (OK), relating the findings with histopathological parameters of inflammatory infiltrate intensity and epithelial lining pattern in RC and site of immunoexpression in RC and OK. The study was characterized as observational, descriptive and retrospective. The sample consisted of twenty RC and 20 OK. Quantitatively analysis of the investigated proteins by immunohistochemical expression was carried out through the analysis of 10 microscopic fields with greater immunoreactivity and descriptive statistics were used to characterize the sample. The data obtained from the evaluation of the percentages of immunopositivity for galectin-1, Bcl-2, Bax and caspase-3 were submitted to statistics. A significance level of 5% ($p < 0.05$) was considered. Morphological analysis in epithelial lining of RC revealed 12 cases (60.0%) with hyperplastic epithelial pattern and 8 cases (40.0%) with atrophic pattern. The inflammatory infiltrate revealed 12 cases (60.0%) with inflammatory infiltrate grade III, 6 cases (30.0%) with grade II and only 2 cases (10.0%) with grade I. In the RC epithelial lining, the highest immunoexpressions of galectin-1 (cytoplasmic/membrane) and caspase-3 were in the para-basal/superficial region, Bcl2 in the basal/para-basal layer and Bax in all layers. OK showed higher immunoexpression for galectin-1 (cytoplasmic/membrane), Bcl-2 and Bax in the basal/para-basal layer. The expression of galectin-1 (nuclear) was evidenced in 1 case of RC and caspase-3 in only 3 cases of OK. Statistical associations were identified in the immunoexpression of Bcl-2 in epithelium and fibrous capsule of RC and OK, Bax expression in the epithelium of RC and OK, nuclear expression of galectin-1 and caspase-3 in the fibrous capsule of CR, in relation to inflammatory infiltrate ($p < 0.05$). Apoptosis interferes in different ways in RC and OK and galectin-1 participates in the regulation of the immunoinflammatory mechanisms of RC.

Keywords: galectins; immunohistochemistry; jaw cysts; radicular cysts; odontogenic keratocysts; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

TESE

Figura 1 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da galectina-1, Bcl-2, Bax e Caspase-3. (A) Expressão da galectina-1 no epitélio de revestimento de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (B) Expressão do Bcl-2 no revestimento epitelial de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (C) Intensa imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (D) Expressão da caspase-3 epitélio de revestimento de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (E) Expressão citoplasmática/membranar da galectina-1 no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400).). (F) Imunoexpressão do Bcl-2 no infiltrado inflamatório da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400).). (G) Elevada expressão do Bax no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400).). (H) Baixa imunoexpressão da caspase-3 (seta) no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400).). (I) Imunoexpressão da galectina-1 no revestimento epitelial de CO(*EnVisionTM Flex*, x400). (J) Padrão de imunoexpressão do Bcl-2 na camada basal/parabasal do epitélio de revestimento de CO(*EnVisionTM Flex*, x400). (K) Imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CO, com destaque para a expressão parabasal/superficial (*EnVisionTM Flex*, x400). (L) Ausência de imunoexpressão da caspase-3 no revestimento epitelial de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (M) Baixa imunoexpressão da galectina-1 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (O) Expressão imunoistoquímica do Bax na cápsula fibrosa de CO

(*EnVision™ Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVision™ Flex*, x400). (O) Expressão do Bax na cápsula fibrosa de CO (*EnVision™ Flex*, x400). (P) Ausência de imunoexpressão da caspase-3 na cápsula fibrosa de CO (*EnVision™ Flex*, x400).

44

Figura 2 – Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR e CO.

47

Figura 3 – Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR de acordo com o padrão do revestimento epitelial.

48

Figura 4 – Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório

50

ARTIGO - AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À APOPTOSE EM CISTOS RADICULARES E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS

Figura 1 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da galectina-1, Bcl-2, Bax e Caspase-3. (A) Expressão da galectina-1 no epitélio de revestimento de CR (*EnVision™ Flex*, x400). (B) Expressão do Bcl-2 no revestimento epitelial de CR (*EnVision™ Flex*, x400). (C) Intensa imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CR (*EnVision™ Flex*, x400). (D) Expressão da caspase-3 epitélio de revestimento de CR (*EnVision™ Flex*, x400). (E) Expressão citoplasmática/membranar da galectina-1 no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVision™ Flex*, x400). (F) Imunoexpressão do Bcl-2 no infiltrado inflamatório da cápsula fibrosa de CR (*EnVision™ Flex*,

x400).). (G) Elevada expressão do Bax no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400).). (H) Baixa imunoeexpressão da caspase-3 (seta) no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400).). (I) Imunoexpressão da galectina-1 no revestimento epitelial de CO(*EnVisionTM Flex*, x400). (J) Padrão de imunoeexpressão do Bcl-2 na camada basal/parabasal do epitélio de revestimento de CO(*EnVisionTM Flex*, x400). (K) Imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CO, com destaque para a expressão parabasal/superficial (*EnVisionTM Flex*, x400). (L) Ausência de imunoeexpressão da caspase-3 no revestimento epitelial de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (M) Baixa imunoeexpressão da galectina-1 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (O) Expressão imunoistoquímica do Bax na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (O) Expressão do Bax na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (P) Ausência de imunoeexpressão da caspase-3 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400).

70

Figura 2 – Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR e CO. No revestimento epitelial (C) e na cápsula fibrosa (D) dos CR de acordo com o padrão do revestimento epitelial e no revestimento epitelial (E) e na cápsula fibrosa (F) dos CR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório.

72

LISTA DE QUADROS

TESE

Quadro 1 –	Variável dependente analisada no estudo.	33
Quadro 2 –	Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.	34
Quadro 3 –	Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-bax, anti-bcl-2, anti-caspase -3 e anti-galectina -1.	36

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 –	Dados clínicos dos casos de CR e CO.	40
Tabela 2 –	Distribuição dos casos de CR e CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial.	42

ARTIGO

Tabela 1 –	Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectina 1, anti-bax, anti-bcl-2 e anti-caspase-3 clivada.	67
Tabela 2 –	Distribuição dos casos de CR e CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetro
Bax	Regulador apoptótico BAX, codificado pelo gene BAX
Bcl-2	Célula-B de Linfoma 2.
CD	Cistos dentígeros
CO	Ceratocistos odontogênicos
CR	Cistos radiculares
DNA	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucleico
DR-4	Do inglês <i>death receptor</i> , traduzido como receptor de morte 4.
DR-5	Do inglês <i>death receptor</i> , traduzido como receptor de morte 5.
Fas	Proteína que em humanos é codificada pelo o gene <i>FAS</i>
FasL	Ligante Fas
H.E	Hematoxilina e Eosina
Ig	Imunoglobulina.
IgA	Imunoglobulina A.
IgG	Imunoglobulina G.
IgM	Imunoglobulina M.
IL-10	Do inglês <i>interleukin-10</i> , traduzido como interleucina-10.
ImageJ	Do inglês, <i>Imaging Processing and Analysis in Java</i> .
kDa	Kilodalton.
Ki-67	<u>Proteína</u> que em humanos é codificada pelo <u>gene</u> <i>MKI67</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Proteína 53
PTCH1	Do inglês, <i>Protein patched homolog 1</i> , traduzido como proteína patched homóloga 1
SCBN	Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide
SPSS	Do inglês <i>statistical package for the social sciences</i> , traduzido como pacote de serviço estatístico para as ciências sociais.

Th1	Do inglês <i>T helper 1</i> , traduzido como célula T auxiliar.
TNF- α	Do inglês, <u>tumor necrosis factor</u> α . traduzido como fator de necrose tumoral α .
TRAIL	Do inglês, <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> , traduzido como ligante indutor de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco.
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	CISTOS ODONTOGÊNICOS	21
1.1.1	<i>Cistos radiculares</i>	22
1.1.2	<i>Ceratocistos odontogênicos</i>	24
1.2	MECANISMOS DE APOPTOSE	26
1.3	GALECTINAS	29
1.3.1	<i>Galectina-1</i>	30
2	METODOLOGIA	32
2.1	ASPECTOS ÉTICOS	32
2.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	32
2.3	POPULAÇÃO	32
2.4	AMOSTRA	32
2.4.1	<i>Critérios de inclusão</i>	32
2.4.2	<i>Critérios de exclusão</i>	33
2.5	VARIÁVEIS	33
2.6	ESTUDO MORFOLÓGICO	34
2.7	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	35
2.7.1	<i>Método imunoistoquímico</i>	35
2.7.2	<i>Análise imunoistoquímica</i>	38
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
3	RESULTADOS	40
4	CONCLUSÃO	51
5	AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À APOPTOSE EM CISTOS RADICULARES E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS	52
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE A – FICHA PARA COLETA DE DADOS MORFOLÓGICOS DAS LESÕES.	83
	APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS REFERENTE À ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PELOS ANTICORPOS ANTI-	

	GALECTINA-1, ANTI-BAX, ANTI-BCL-2 E ANTI-CASPASE-3.	84
ANEXO A –	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	85
ANEXO B –	NORMAS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NO PERIÓDICO <i>JOURNAL OF ENDODONTICS</i>	90

1 INTRODUÇÃO

Os cistos odontogênicos são lesões que afetam os tecidos orais e maxilo-faciais resultantes de processos inflamatórios ou decorrentes de falhas no desenvolvimento maxilo facial (1). Histologicamente, estas lesões são consideradas cavidades patológicas, na maioria das vezes intraósseas, revestidas por um epitélio odontogênico e preenchidas com conteúdo fluido ou semifluido e frequentemente cercado por um tecido conjuntivo fibroso, por vezes, inflamado (1-4).

Diversos estudos epidemiológicos relatam a prevalência das lesões císticas de origem odontogênica em relação à outras lesões identificadas nos ossos gnáticos (7-11). Dentre estas lesões, os cistos radiculares (CR), cistos dentígeros (CD) e ceratocistos odontogênicos (CO) têm demonstrado as maiores frequências (2, 3, 9, 11-16).

Os CR representam o cisto odontogênico mais comum (17). São lesões císticas inflamatórias que se desenvolvem no ápice de um dente não vital, a partir da degeneração de restos celulares de Malassez, decorrente da estimulação inflamatória proveniente da polpa necrótica (10, 18, 19).

Já o CO é considerado uma lesão cística agressiva e propensa à recorrência. Quando anteriormente classificado pela OMS como tumor, era considerado o mais comum (8). Apesar de seu comportamento agressivo, a maioria dos casos de CO não causam grandes expansões ósseas (20).

As lesões císticas de origem odontogênica representam um conjunto numericamente importante do total de biópsias em hospitais e centros universitários especializados (13). Contudo, apesar destas lesões compartilharem algumas características clínicas, radiográficas e até histopatológicas, sabe-se que o comportamento biológico relacionado à recorrência, crescimento e potencial malignização podem diferir entre elas (10, 14).

Segundo Soluk Tekkeşin, Mutlu e Olgaç (21), a apoptose, também conhecida como morte celular programada ou morte celular fisiológica, desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção da homeostase nos organismos multicelulares. Para Tenório *et al.* (22), defeitos na regulação da apoptose e do ciclo celular podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão de lesões odontogênicas. Entretanto, o papel das proteínas apoptóticas na odontogênese e no

desenvolvimento de lesões odontogênicas císticas e neoplásicas ainda necessitam de maiores esclarecimentos.

De acordo com Cummings, Liu e Vasta (23), várias galectinas estão envolvidas nos mecanismos de apoptose, com destaque para a galectina-1, cuja atividade foi encontrada em maior frequência nas células T humanas. A compreensão dos caminhos bioquímicos e dos mecanismos que regulam a indução da apoptose por meio da galectina-1 oferece uma oportunidade notável de manipular decisões de vida e morte celular. Segundo Rabinovich *et al.* (24), estes conhecimentos podem abrir novas vias, não apenas no nível básico de pesquisa biomédica, mas também em diagnóstico de doenças, prognósticos e terapias clínicas.

Segundo Alsaegh, Altaie e Zhu (25), o estudo das lesões odontogênicas é necessário, a fim de verificar se os mecanismos de apoptose pela via extrínseca encontram-se envolvidos na patogênese destas lesões e se explicam suas diferenças no comportamento biológico.

1.1 CISTOS ODONTOGÊNICOS

Os cistos odontogênicos são considerados lesões ósteo-destrutivas que se originam a partir de remanescentes epiteliais e mesenquimais da embriogênese dentária, tais como os restos epiteliais de Malassez, restos de Serres e folículo pericoronário. (3, 10, 26, 27). As lesões císticas dos ossos gnáticos podem compartilhar características clínicas, radiográficas e histopatológicas. Nesse contexto, o conhecimento da prevalência destas lesões, assim como os locais mais comuns e a distribuição entre as idades, são características que podem auxiliar os profissionais na determinação diagnóstica (3).

Em sua mais recente classificação, a OMS categoriza os CO, CD, cistos gengivais, cistos periodontais laterais, cistos odontogênicos calcificantes e cistos odontogênicos glandulares em cistos odontogênicos de desenvolvimento. Já os CR e cistos paradentários, em cistos odontogênicos inflamatórios (7).

Estudos epidemiológicos são necessários e constituem uma fonte confiável de referência para que os profissionais da saúde avaliem e tratem seus pacientes com maior precisão. Além disso, são cruciais para a implantação e manutenção de programas de saúde bucal para as populações (5, 10, 28).

Segundo Pereira e Nery (29), a determinação de grupos de risco torna possível direcionar, com maior precisão, as ações de saúde e prevenção da doença. Com o intuito de identificar o perfil epidemiológico de lesões císticas odontogênicas e não odontogênicas em uma população brasileira, Grossmann et al. (3) identificaram que os CR corresponderam a 61% das lesões císticas avaliadas, seguidos, respectivamente, do CD (25,3%) e do CO (7,2%). Os CO foram identificados, predominantemente, entre a segunda e a quarta década de vida (66,9%) e a região posterior de mandíbula foi o local de maior prevalência (33,5%).

De modo semelhante, outros estudos epidemiológicos em diferentes populações brasileiras têm evidenciado que os CR são as lesões odontogênicas de maior prevalência, e acometem mais frequentemente pacientes entre a segunda e a quinta décadas de vida, e têm a mandíbula como localização mais comum (15, 28, 30-32). O gênero masculino têm sido relatado como o de maior prevalência entre as lesões císticas dos ossos gnáticos (5, 8, 10, 11, 33).

1.1.1 Cistos radiculares

Os CR são os cistos odontogênicos inflamatórios mais comuns dos maxilares, cuja fonte de inflamação é associada a periodontite apical decorrente da necrose pulpar de um dente infectado (1, 9, 10, 16, 34, 35). A maioria dos CR são assintomáticos e descobertos em radiografias periapicais de rotina. Radiograficamente, os CR são identificados como uma lesão radiolúcida unilocular associada à porção periapical do canal radicular (27,36).

Os CR estão sempre associados à raiz de um dente não vital, sendo este um importante critério diagnóstico para lesões radiolúcidas associadas ao ápice radicular dos dentes (37). Diversas teorias têm sido propostas ao longo dos anos a fim de compreender a patogênese dos CR. Dentre estas, destaca-se a teoria nutricional, onde a falta de suporte de substratos seria a explicação para formação cística periapical. Segundo esta teoria, quando a proliferação celular interna das lesões periapicais inflamatórias não recebe os nutrientes necessários para o metabolismo da lesão, os quais são advindos do tecido conjuntivo adjacente, ocorre degeneração e

morte das células centrais do tecido por liquefação, o que provocaria uma cavitação no interior da lesão (38).

Alguns anos depois, Torabinejad (39) relatou a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN), linfócitos e plasmócitos no epitélio das lesões periapicais, presença de imunoglobulinas (Ig) no fluido cístico, tais como IgA, IgM e IgG, e a descontinuidade nos revestimentos epiteliais na maioria destes cistos. Assim, foi sugerido que os eventos bioquímicos e celulares da inflamação, e os moduladores da matriz extracelular pareciam estar envolvidos na formação e desenvolvimento das lesões periapicais crônicas, concluindo que um elemento-chave no desenvolvimento e regressão dos CR é a resposta imune.

Segundo Shear e Speight (4) e García et al. (40), o desenvolvimento dos CR ocorre provavelmente em três fases. Durante a primeira fase, os restos epiteliais de Malassez em repouso, começam a proliferar como resultado direto da inflamação, influenciados por antígenos bacterianos, fatores de crescimento e mediadores do metabolismo celular. Na segunda fase, uma cavidade revestida por epitélio é formada e na terceira fase, o cisto se desenvolve, provavelmente por pressão osmótica. De forma semelhante, Bilodeau e Collins (18) e Martin e Speight (34) os CR surgem da expansão de remanescentes epiteliais residuais do desenvolvimento do dente, ou seja, o alargamento cístico ocorre devido à pressão hidrostática conforme os detritos se acumulam centralmente na lesão.

O diagnóstico e o tratamento de lesões radiolúcidas associadas à região periapical requerem um registro meticuloso da história clínica, testes de sensibilidade pulpar, avaliação de evidências radiográficas antes da intervenção terapêutica (41, 42). Segundo Lizio et al. (43) a aparência radiolúcida de um CR está associada à reabsorção óssea como resultado da resposta do hospedeiro ao processo de infecção radicular. Os CR estão frequentemente associados à expansão de cortical óssea, seja ela vestibular ou palatino/lingual. Geralmente, são lesões radiolúcidas, menores que 1,0 cm em diâmetro, uniloculares, de margens bem definidas e que podem continuar a expandir caso não sejam tratadas adequadamente (1, 18).

Histopatologicamente, o CR exibe uma cavidade cística revestida parcial ou totalmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, frequentemente circundado por um tecido conjuntivo permeado por um infiltrado de células inflamatórias predominantemente mononucleadas (1, 36, 44, 45). De acordo com Cury et al. (46), para que ocorra um crescimento cístico, é necessária uma proliferação

epitelial. Assim, CR revestidos por um epitélio hiperplásico podem ser considerados com maior atividade do que os cistos revestidos por epitélio atrófico. Assim, estes autores propuseram que os cistos que apresentavam predominantemente, em sua maior extensão, um revestimento epitelial constituído por 2 a 10 camadas de células, cujas interfaces epitélio/cápsula apresentavam-se planas, devem ser considerados epitélios atróficos. Já os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável e com interfaces epitélio/cápsula arciformes, devem ser considerados como epitélios hiperplásicos.

Segundo Moreira et al. (47), embora os CR possam se apresentar como lesões expansíveis, eles também podem apresentar períodos de quiescência. Esses períodos não são previsíveis, mas podem ser avaliados histopatologicamente pelo estado do epitélio cístico, sendo este um parâmetro histológico confiável da atividade biológica. Em lesões quiescentes, apesar da presença de antígenos e enzimas no microambiente serem capazes de induzir respostas imunológicas, o alargamento cístico, a proliferação epitelial e reabsorção óssea não ocorrem. Assim, efetores imunossupressores podem operar em tais fases, a fim de regular a expansão cística.

De acordo com Bernardi et al. (48), o equilíbrio entre o crescimento celular e a apoptose está provavelmente relacionado com mecanismos associados ao estabelecimento, crescimento e manutenção dos CR. Segundo Márton e Kiss (49), uma rede de fatores inibitórios e estimulatórios pode influenciar a intensidade de defesa e as respostas inflamatórias das lesões periapicais. Embora seja reconhecida a participação da resposta imune na formação de lesões periapicais, os mecanismos envolvidos na sua patogênese ainda não foram completamente definidos (50-55).

1.1.2 Ceratocistos odontogênicos

Segundo Bianco et al. (56), as classificações publicadas pela OMS refletem o estado do conhecimento acerca dos cistos e tumores odontogênicos. Contudo, adaptações ou atualizações para essa classificação vão se tornando necessárias conforme as experiências clínicas e científicas se acumulam. Nesse contexto, as primeiras classificações propostas pela OMS (1971 e 1992) categorizaram o CO como um cisto odontogênico de desenvolvimento (34, 56, 57, 58).

Todavia, em 2005, a OMS classificou o CO como uma lesão tumoral, sendo denominado tumor odontogênico ceratocisto. Essa mudança na terminologia foi

justificada devido ao seu comportamento ser semelhante ao de uma neoplasia, e não de uma lesão cística odontogênica, tendo em vista a alta tendência à recorrência, presença de cistos satélites, crescimento infiltrativo e associações com mutação do gene supressor de tumor PTCH e com a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (SCBN), também conhecido como síndrome de Gorlin-Goltz. (59, 60, 61).

A perda de heterozigose observada na região 9q22.3 (onde o gene PTCH1 foi mapeado) também foi identificada em outras lesões císticas de desenvolvimento (56, 62, 63), assim como nos CO não sindrômicos (64). Desse modo, devido à falta de evidências científicas que suportassem sua natureza neoplásica, o CO foi reclassificado pela OMS (2017) com uma lesão cística odontogênica de desenvolvimento (7, 16). Segundo Alsaegh, Altaie e Zhu (25), as controvérsias observadas na classificação dos CO refletem as limitações no conhecimento acerca das bases moleculares envolvidas na patogênese dessa lesão.

De acordo com Tamiolakis et al. (11), os CO apresentam uma leve predileção por homens, com média de idade de 42,5 anos e são identificados, preferencialmente, na região dos molares na mandíbula. Os CO são considerados lesões benignas, porém de comportamento agressivo, e que correspondem a aproximadamente 10% de todas as lesões císticas de origem odontogênica. Adicionalmente, sabe-se que a presença de vários CO ocorrendo em diferentes momentos durante a vida dos pacientes e com potencial de destruição local, estão associados à SCBN (37, 60, 64).

De acordo com Khan et al. (65), aproximadamente metade de todos CO ocorrem no ângulo da mandíbula e se estendem por distâncias variadas desde o ramo ascendente até a região anterior ao corpo mandibular. Estas lesões apresentam tendência de desenvolvimento no sentido ântero-posterior, o que não provoca grande abaulamento da cortical óssea. A maioria das lesões são assintomáticas e descobertas acidentalmente em exames radiográficos de rotina e, quando extensas, podem causar deslocamento dos dentes adjacentes (7, 64). Radiograficamente, os CO são identificados como lesões radiolúcidas bem definidas que podem se apresentar, predominantemente como uniloculares, ou multiloculares (1, 61). O CO é um cisto com comportamento clínico variável, tendo em vista sua capacidade infiltrativa e alto risco de recorrência (27, 66).

Histopatologicamente, os CO surgem da lâmina dentária e são constituídos por uma cavidade cística, contendo ceratina descamada, e revestidos por um epitélio escamoso estratificado de espessura uniforme e superfície paraqueratinizada. Este

epitélio apresenta uma camada basal distinta de células colunares ou cuboidais paliçadas, cujos núcleos tendem a ser hipercromados e orientados verticalmente. Adicionalmente, figuras mitóticas são frequentemente vistas, mas são consideradas normais (7, 18, 34).

Há um equilíbrio regulado entre a proliferação celular, diferenciação e morte celular no CO (67). Assim, quando um processo inflamatório está presente, diferenças na espessura do epitélio de CO podem ser observadas. Estas mudanças na morfologia epitelial podem afetar a proliferação do epitélio e acarretar mudanças no comportamento biológico destas lesões. Contudo, os mecanismos envolvidos no processo inflamatório, na atividade proliferativa e no comportamento agressivo dos CO necessitam de maiores esclarecimentos (68, 69).

Novos estudos podem auxiliar no melhor entendimento da etiologia e a patogênese das lesões odontogênicas, uma vez que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento destas lesões não foram completamente esclarecidos (25, 70).

1.2 MECANISMOS DE APOPTOSE

O crescimento e o desenvolvimento são processos essenciais para o sustento de qualquer espécie. Nesse contexto, a proliferação e a morte celular desempenham um papel importante no crescimento dos tecidos (22, 71). As reações apoptóticas, também conhecidas como morte celular programada ou morte celular fisiológica, desempenham um papel importante no desenvolvimento e manutenção da homeostase dentro de tecidos normais ou patológicos, e são moduladas por diversas proteínas (21, 71-74).

Segundo Kichi et al. (67), existe um equilíbrio regulado entre proliferação celular, diferenciação celular e morte celular em lesões císticas de origem odontogênica. De acordo com o estudo realizado por Mateus et al. (75), o índice de proliferação epitelial em CO revelou-se elevado na camada suprabasal do epitélio destas lesões, evidenciando que o revestimento epitelial do CO apresenta diferentes padrões de proliferação e diferenciação celular. Amaral et al. (76) sugeriram que a alta atividade proliferativa do CO, quando comparado ao ameloblastoma, pode estar relacionada ao comportamento clínico agressivo destas lesões.

Para Loreto et al. (77), o epitélio de revestimento de CR pode parar de proliferar após o tratamento endodôntico devido a uma redução nos mediadores inflamatórios,

citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento. Desse modo, estas lesões poderiam realmente regredir por causa da ativação da apoptose, devido a uma redução nos fatores de sobrevivência ou aos sinais de morte recebidos durante a cicatrização da lesão periapical.

Ao identificarem a ocorrência de apoptose e proliferação celular na camada basal do revestimento epitelial dos CR, Martins et al. (78) observaram que a expressão do ki-67 (um marcador de proliferação celular) foi significativamente maior no epitélio hiperplásico, quando comparado ao padrão de revestimento atrófico. Desse modo, estes autores sugeriram que a presença da inflamação pode influenciar na atividade proliferativa destas lesões.

A família Bcl-2 inclui supressores e promotores de morte celular, destacando-se que dentro desta família, Bax e o Bcl-2 são considerados como os mais importantes reguladores apoptóticos. A proteína Bcl-2 é inibidora da apoptose e a sua expressão na membrana mitocondrial externa inibe a translocação do citocromo-c para o citosol, fato considerado crítico no processo apoptótico (21, 79).

Segundo Kichi et al. (67), o Bcl-2 inibe a apoptose em CO com o intuito de facilitar a proliferação celular na camada basal, permitindo assim a síntese de grandes quantidades de queratina na camada superficial dos CO. Para Slusarenko Silva e Naclério-Homem (80), o crescimento do CO deve ser atribuído ao efeito anti-apoptótico do Bcl-2 no epitélio de revestimento cístico, e não apenas ao aumento de sua pressão intraluminal, comumente visto em outras lesões císticas de origem odontogênica. Ao identificarem uma maior expressão do Bcl-2 na camada basal e suprabasal de alguns CO, Orikpete, Omoregie e Ojo (71) sugeriram que esta expressão pode estar relacionada à uma maior agressividade das referidas lesões.

Sabe-se que o Bax é considerado uma proteína pró-apoptótica antagonista do Bcl-2. (21, 78). A superexpressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 não só previne a oligomerização do Bax, como também inibe sua alteração conformacional e translocação mitocondrial (81). Segundo Wang (82), a oligomerização do Bax na membrana mitocondrial leva à permeabilização mitocondrial, permitindo o efluxo de fatores apoptóticos, levando à disfunção mitocondrial, que eventualmente causa morte celular.

No âmbito das lesões periapicais Suzuki et al. (73) identificaram que os CR com infiltrado inflamatório intenso evidenciaram uma maior imunoexpressão do Bax. Já os CR com infiltrado inflamatório leve, apresentaram maior imunoexpressão do Bcl-2.

Estes resultados sugeriram que os membros da família Bcl-2 são afetados pelos processos inflamatórios das lesões periapicais.

Ao avaliar a expressão imunoistoquímica do Bax, Bcl-2 e do p53 em lesões de origem odontogênica, Tenório et al. (22) observaram que estas proteínas são expressas de formas diferentes nas lesões odontogênicas epiteliais, podendo correlacionar a expressão destas com o comportamento biológico diverso destas lesões. Assim, um desequilíbrio entre essas proteínas pode induzir desregulação da apoptose.

A morte celular programada é um processo coordenado que também envolve a ativação de um grupo de cisteínas proteases denominadas caspases, as quais, através de uma complexa cascata de eventos, estimulam a morte celular (83). Os mecanismos apoptóticos podem ser ativados pela via intrínseca, mediada por mitocôndrias, ou pela via extrínseca, induzida por ligantes de sinalização de morte como TNF α e FasL. Na via extrínseca, observa-se a ativação de receptores de morte, como TNF, FasL, TRAIL (que ativa receptores de morte DR-4 e DR-5), que resultam na ativação da caspase-8, que por sua vez, cliva a pró-caspase, gerando caspase-3. Esta última é considerada uma caspase executora, uma vez que atua destruindo o citoesqueleto celular e proteínas reparadoras, culminado na fragmentação do DNA (77, 84).

Segundo Park et al. (85), algumas caspases agem como indutoras (caspases-2, 8 e 9) ou como executoras (caspases-3, 6 e 7) da apoptose. Dentre estas, a caspase-3 é amplamente apontada como a marca registrada da apoptose, sendo considerada um ponto determinante para a morte celular (81). Estudos abordando a participação da caspase-3 no revestimento epitelial de CR tem sido pouco relatados na literatura. Devido a importância da apoptose na patogênese das lesões radiculares, novos estudos são necessários para esclarecer a participação dessas moléculas no desenvolvimento destas lesões (77, 78, 86).

De acordo com da Costa et al. (86), a imunoexpressão da caspase-3 em cistos e tumores odontogênicos pode ser importante para explicar quais componentes celulares (capsula ou epitélio) estão relacionados ao comportamento dessas lesões. Além disso, essas moléculas podem ser usadas como marcadores biológicos no futuro, servindo como instrumentos para melhor diagnóstico e planejamento de tratamento (86, 87).

Esforços têm sido feitos para determinar o comportamento biológico dessas

lesões odontogênicas usando diferentes marcadores. Nesse contexto, a avaliação dos índices proliferativos e antiapoptóticos dessas lesões pode ajudar em uma melhor compreensão do seu comportamento (71). No entanto, outros estudos são necessários para entender melhor o mecanismo da involução ou manutenção das lesões císticas odontogênicas (77, 78, 88).

1.3 GALECTINAS

As galectinas correspondem a uma classe de lectinas com afinidade por β -galactosídeos que possui diversas funções, tanto no meio intracelular (citossol, núcleo, mitocôndria ou associadas às membranas plasmáticas) quanto no meio extracelular (89, 90). Essas moléculas podem atuar em diversos mecanismos biológicos, tais como inflamação, regulação da atividade imune celular, quimiotaxia e síntese de mediadores inflamatórios, mecanismos de proliferação celular, autofagia e apoptose (23, 90 - 93).

A literatura destaca que as galectinas foram isoladas e classificadas em três subgrupos de acordo com seus domínios de reconhecimento de carboidratos (DRC): As prototípicas ou monovalentes são aquelas que possuem um único DRC e podem se associar formando homodímeros (galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15, -16). As galectinas de repetição tandem ou bivalentes possuem dois DRC e estão conectadas entre si através de um peptídeo (galectinas -4, -6, -8, -9 e -12). A galectina-3 é conhecida como galectina quimérica, uma vez que possui um único DRC e uma única terminação amino (23, 92, 94, 95, 96).

Segundo Brinchmann, Patel e Iversen (92), as galectinas podem atuar como moduladoras negativas e positivas dos mesmos processos, devido a plasticidade das suas isoformas. Nos mecanismos envolvidos na apoptose, Cummings, Liu e Vasta (23) ressaltaram que várias galectinas estão envolvidas nestes mecanismos, com destaque para a galectina-1, cuja atividade foi encontrada em maior frequência nas células T humanas. Para estas lectinas as vias apoptóticas podem estar relacionadas às glicoproteínas de superfície celular, tais como o CD7, CD29 e o CD43.

Segundo Oliveira et al. (97), a patogênese da doença periapical ocorre através de uma interação complexa entre as muitas moléculas bioativas envolvidas nas respostas imunológicas, e a expressão das galectinas pode ser um importante mecanismo envolvido na modulação das reações imunes. Em 2018, Brito et al. (98)

também sugeriram a participação das galectinas-1, 3 e 7 nos mecanismos associados à apoptose das lesões periapicais.

Segundo Johannes, Jacob e Leffler (99), embora o conhecimento acerca das galectinas tenha aumentado na última década, uma série de aspectos permanecem necessitando de elucidações. Assim, o conhecimento das funções das galectinas nos tecidos poderá auxiliar em futuras estratégias terapêuticas para doenças e condições associadas.

1.3.1 Galectina-1

A galectina-1, uma lectina homodimérica não covalente de 14 kDa, é membro de uma família de galectinas que expressa afinidade por β -galactosídeos. Essa molécula é abundantemente expressa em vários tipos de células ou tecidos e pode ser identificada no núcleo da célula, na região citoplasmática, superfície celular ou ser secretada para o espaço extracelular. A galectina-1 pode desempenhar uma variedade de funções biológicas, incluindo interações célula-célula e célula-matriz, crescimento e morte celular (90, 100, 101).

Segundo Brinchmann, Patel e Iversen (92), a homeostase das células T pode ser regulada pela galectina-1 através da inibição da expansão clonal e indução de apoptose. De acordo com Shih et al. (100), a galectina-1 está envolvida na regulação da proliferação, apoptose, ciclo celular e angiogênese através da sua forma dimérica.

Em 1995, Perillo et al. (102) relataram que a indução da apoptose por lectinas mamárias endógenas representavam um novo mecanismo para regulação da resposta imune, contudo, o efeito apoptótico da galectina-1 dependeria do estado de ativação das células T. De acordo com Dhirapong et al. (103), a função apoptótica da galectina-1 sobre células T ativadas auxilia na manutenção da tolerância imunológica.

Segundo Norling et al. (104), a expressão da galectina-1 é aumentada em células endoteliais expostas a estímulos pró-inflamatórios, sendo capaz de induzir a apoptose dos linfócitos T ativados. Segundo estes autores, durante a inflamação, os níveis de galectina-1 da superfície celular e em células endoteliais são aumentados, em uma tentativa de limitar o influxo de leucócitos para os tecidos circundantes, com o intuito de conter a resposta inflamatória.

A ligação entre a galectina-1 e os glicanos tem semelhanças significativas com o sistema Fas/FasL, pois também é expresso em células T ativadas e é capaz de

induzir a apoptose de células T auxiliares ativadas e altamente diferenciadas. A galectina-1 ativa a apoptose em linfócitos Th1, resultando na indução da expressão de IL-10 e na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, que levam a uma resposta imune limitada (105, 106).

Em estudo realizado buscando a identificação da participação da galectina-1 no desenvolvimento e progressão de lesões tumorais, Tang et al. (107) apontaram a participação da galectina-1 nos mecanismos relacionados à apoptose mediados pelo ligante TRAIL. Os autores relataram que esse ligante é capaz de induzir seletivamente a apoptose através dos seus receptores de morte (DR-4 e DR-5) de origem odontogênica.

De acordo com estudo realizado por Ge et al., (108), a galectina-1 tem uma importante participação na regulação da inflamação nas vias aéreas. Por meio de um estudo in vitro, estes autores observaram a ligação da galectina-1 presente no meio extracelular à eosinófilos que expressavam glicanos carboidrato-dependentes em sua superfície celular. Segundo estes autores, essa ligação induzia a apoptose e favorecia uma inibição da migração celular. Nesse contexto, compreender as vias pelas quais a galectina-1 evoca mudanças no comportamento das células imunes, bem como qualquer interação entre elas, apresenta oportunidades para regular as respostas imunes inatas e adaptativas (109).

A elucidação dos caminhos bioquímicos e dos mecanismos que regulam a indução da apoptose por meio da galectina-1 oferece uma oportunidade notável de orientar decisões de vida e morte celular. No entanto, a resposta imune celular e a participação de cada proteína na modulação da inflamação, expansão cística e mecanismos apoptóticos ainda necessitam de mais esclarecimentos (78, 92, 110, 111). Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a expressão imunoistoquímica do Bax, Bcl-2, caspase-3 e galectina -1 em CR e CO. Dessa forma, possíveis diferenças na imunoexpressão de cada marcador imunoistoquímico com a intensidade do infiltrado inflamatório, o padrão do revestimento epitelial e o local de imunoexpressão foram avaliadas.

2 METODOLOGIA

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

A presente pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetida à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Conforme registro: CAAE: 43884721.1.0000.5208 (ANEXO I), seu protocolo foi aprovado.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi caracterizado como uma pesquisa observacional em base de dados de caráter descritivo, retrospectivo e correlacional da expressão imunoistoquímica das proteínas Bax, Bcl-2, caspase -3 e galectina -1 em uma série de casos de CR e CO.

2.3 POPULAÇÃO

Foram utilizados os casos de CR e CO obtidos nos arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral localizados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) campus Recife (PE), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) campus Natal (RN) e na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) campus Campina Grande (PB) até março de 2021.

2.4 AMOSTRA

O estudo foi realizado com uma amostra não probabilística de conveniência, constituída por 40 espécimes que foram fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina. Destes, foram selecionados 20 CR e 20 casos de CO.

2.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo espécimes diagnosticados histopatologicamente

como CR e CO. Para os CR, foram incluídos somente os espécimes que exibissem uma cavidade patológica revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, e suportando por uma cápsula fibrosa permeada por células inflamatórias. Para os CO, foram incluídos os casos que se apresentaram revestidos por um epitélio escamoso estratificado paraqueratinizado com células basais hipercromáticas em arranjo paliçado contínuo e suportado por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, segundo El-Naggar et al. (2017).

2.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os espécimes com quantidade insuficiente de material biológico nos blocos parafinados, bem como os casos de CR que tiveram relatos de tratamento endodôntico prévio, tendo em vista a possibilidade de mudança de microbiota associada ao tratamento endodôntico, e por conseguinte, o perfil de apresentação do infiltrado inflamatório nessas lesões. Para os CO, os casos que foram tratados por descompressão ou marsupialização, associados à síndrome do carcinoma basocelular nevoide, bem como os casos relatados como recidivantes foram excluídos da amostra.

2.5 VARIÁVEIS

As variáveis dependentes e independentes, analisadas no presente estudo, estão listadas no Quadro 1 e Quadro 2.

Quadro 1 - Variável dependente analisada no estudo.

Variável	Definição	Categoria
Expressão das proteínas Bax, Bcl-2, caspase-3 e galectina-1.	Percentual de células positivas.	- Intracitoplasmáticas/ membrana plasmática. - Nuclear (Galectina-1).

Fonte: o autor, 2021.

Quadro 2 - Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

Variável	Definição	Categoria
Tipo de lesão	Lesões odontogênicas inflamatórias e de desenvolvimento	- Cisto Radicular - Ceratocisto Odontogênico
Intensidade do infiltrado inflamatório nos CR.	Intensidade de células inflamatórias presentes no campo microscópico.	- Grau I - Grau II - Grau III
Revestimento epitelial dos CR	Tipo predominante de revestimento epitelial encontrado nas lesões císticas.	- Atrófico - Hiperplásico
Camada epitelial de imunoexpressão em CR e CO.	Camadas constituintes do epitélio.	-Basal/parabasal -Parabasal/superficial -Superficial -Toda a extensão do revestimento

Fonte: o autor, 2021.

2.6 ESTUDO MORFOLÓGICO

Para o desenvolvimento do estudo morfológico, foi realizada uma avaliação dos aspectos histomorfológicos dos casos selecionados em microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) nos aumentos de 40x, 100x e 400x, com cortes de 5 µm de espessura e corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). A intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como o tipo de revestimento epitelial foram os aspectos histopatológicos analisados nos CR. Um examinador previamente treinado realizou a

análise histomorfológica, e os dados foram transcritos para uma ficha previamente elaborada para o estudo (APÊNDICE A).

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com critérios de Peixoto et al. (112). A partir da porção luminal dos CR em direção à periferia, foi considerado 1 campo microscópico, sob o aumento de 200x. As lesões cujo infiltrado inflamatório se apresentaram restritos à um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I (leve infiltrado); quando as células inflamatórias estavam presentes entre um e dois terços foram definidas como de grau II (moderado infiltrado); e os CR que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços foram categorizadas como de grau III (intenso infiltrado).

O padrão de revestimento epitelial foi analisado de acordo com metodologia de Moreira et al. (47). Com base no padrão predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os CR que apresentaram, em sua maior extensão, a camada epitelial constituída por 2 a 10 camadas de células de espessura, e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial plana. Já os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial ondulada foram considerados hiperplásicos.

Em relação à avaliação das camadas constituintes do epitélio, foi adaptada a classificação proposta por Leonardi et al. (113), onde os CR e CO foram classificados, de acordo com o predomínio da imunorreatividade para as proteínas avaliadas nas camadas epiteliais, em: imunomarcção em camada basal/parabasal, imunomarcção em camada parabasal/superficial, imunomarcção em camada superficial e imunomarcção em toda a extensão do revestimento.

2.7 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

2.7.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, previamente fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriethoxysilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Envision Flex+, Dako, Agilent, Santa Clara, CA, EUA),

utilizando anticorpos monoclonais anti-galectina-1, anti-bax, anti-bcl-2 e anti-caspase-3 (Quadro 3).

Cortes histológicos de tonsilas foram utilizados como controle positivo. Como controle negativo, as amostras foram tratadas como anteriormente descrito, exceto pela omissão dos anticorpos primários no protocolo de imunoistoquímica seguido pelo Laboratório de Patologia Oral da UEPB. Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado sob a microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE).

Quadro 3 - Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-bax, anti-bcl-2, anti-caspase -3 e anti-galectina -1.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Galectina-1	(C-45)	Santa Cruz Biotechnology	1:2500	Citrato pH 6.0 <i>Steamer</i> , 60'	overnight
Bax	(2D2)	Scytek	1:400	Tris-EDTA pH 9,0 60 min <i>Steamer</i>	overnight
Bcl-2	(2D2)	Dako	1:150	Tris-EDTA pH 9,0 60 min <i>Steamer</i>	overnight
Caspase-3 (clivada)	(5A1E)	Cell Signaling	1:1500	Citrato pH 6.0 60 min <i>Steamer</i>	overnight

Fonte: o autor, 2021.

A técnica de imunoistoquímica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol aquecido (15 minutos cada);
- ⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);

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

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

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Recuperação antigênica;

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*EnVision™ Flex antibody diluent, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida;

⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Incubação com anticorpo secundário polimerizado à peroxidase (*EnVision™ Flex/HRP, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);

⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*EnVision™ Flex DAB+, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*) (10 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Contracoloração com hematoxilina de Harris, à temperatura ambiente (1 minuto);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Desidratação em álcool absoluto:

- Álcool etílico absoluto I (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);

⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);

⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

2.7.2 Análise imunoistoquímica

A análise da expressão imunoistoquímica do Bax, Bcl-2 e caspase-3 em CR e CO foi fundamentada na positividade da marcação, sendo consideradas positivas as células (inflamatórias e epiteliais) que apresentaram pigmentos de coloração acastanhada no compartimento citoplasmático/membranar. Já para a galectina-1, foram consideradas positivas as células inflamatórias e epiteliais que apresentaram coloração acastanhada na porção nuclear e/ou citoplasmática/membranar. A avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas Bax, Bcl-2, caspase-3 e galectina -1 em CR e CO foi realizada quantitativamente por um observador previamente calibrado, e os dados foram anotados em fichas elaboradas previamente para o estudo (APÊNDICE B).

As avaliações das imunoexpressões dos biomarcadores pesquisados foi estabelecida mediante a análise separada de 10 campos microscópicos com maior imunorreatividade, sendo 5 campos para o componente epitelial e 5 para o conjuntivo, em aumento de 200x após a identificação das áreas com maior quantidade de células imunorreativas em aumento de 400x. Cada uma destas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador, com o auxílio do programa *ImageJ®* (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). A expressão imunoistoquímica citoplasmática/membranar do Bax, Bcl-2, caspase-3 e citoplasmática/membranar e nuclear da galectina-1 foi determinada a partir da contagem de todas as células (inflamatórias e epiteliais) presentes em cada campo microscópio, onde foi estabelecido o percentual de células imunopositivas com a marcação citoplasmática e/ou nuclear em relação ao número total de células encontradas, adaptando assim, a metodologia de Oliveira et al. (97).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007®). Os resultados obtidos com os estudos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (Versão 20.0, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA).

Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3, de acordo com os grupos de lesões e as características histopatológicas dos CR. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Perfil Demográfico

Os CR avaliados estavam localizados, predominantemente, na região de maxila (80,0%), em pacientes do sexo feminino (60,0%) com média de idade de 36,2 anos (desvio padrão $\pm 16,7$). Já os CO estavam presentes, em sua maioria, na região de mandíbula (80,0%), em mulheres (75,0%) com média de idade de 34,1 anos (desvio padrão $\pm 19,4$), conforme os dados dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados clínicos dos casos de CR e CO.

Dados clínicos	CR	CO
<i>Idade (em anos)</i>		
Variação	13 – 75	8 – 69
Média $\pm$ desvio padrão	36,2 $\pm$ 16,7	34,1 $\pm$ 19,4
<i>Sexo</i>		
Feminino	12 (60,0%)	15 (75,0%)
Masculino	8 (40,0%)	5 (25,0%)
<i>Localização anatômica</i>		
Maxila	16 (80,0%)	4 (20,0%)
Mandíbula	4 (20,0%)	16 (80,0%)

Fonte: o autor, 2021.

Perfil Morfológico

A análise do revestimento epitelial dos CR revelou que 12 casos (60,0%) apresentavam padrão epitelial hiperplásico e 8 casos (40,0%), padrão atrófico. Já o infiltrado inflamatório evidenciou que 12 casos (60,0%) apresentavam infiltrado inflamatório grau III, 6 casos (30,0%) grau II e apenas 2 casos (10,0%) com grau I.

Análise Imunoistoquímica

A expressão nuclear de galectina-1 em revestimento epitelial foi constatada em apenas 1 caso de CR. Por sua vez, apenas 3 casos de CO apresentaram positividade para caspase-3 no revestimento epitelial. Dessa forma, os dados referentes às expressões dessas proteínas nesses compartimentos foram analisados apenas por meio de estatística descritiva.

Imunoexpressão de galectina-1

Ao avaliar o revestimento epitelial, foi constatada positividade de imunoexpressão citoplasmática para a galectina-1 em 9 casos de CR (45,0%) e em 15 casos de CO (75,0%) (Figura 1 A e I). A imunoexpressão da galectina-1 no núcleo das células do revestimento epitelial foi observada em apenas 1 (5,0%) CR e ausente nos CO. Em relação às camadas do revestimento epitelial, para os casos positivos, houve predomínio de expressão na camada parabasal/superficial dos CR (77,8%) e na região basal/parabasal dos CO (93,3%), conforme Tabela 2.

Para a região de cápsula, observou-se positividade de imunoexpressão citoplasmática da galectina-1 em todos os CR e CO analisados. Já a imunoexpressão nuclear da galectina-1 foi observada em 18 casos de CR (90,0%) e 15 casos de CO (75,0%) (Figura 1 E e M).

Imunoexpressão de Bcl-2

A avaliação da imunoexpressão do Bcl-2 no revestimento epitelial foi identificada em todos os CO (100,0%) e em 17 CR (85,0%), conforme figura 1 (B e J). Para os casos positivos, houve predomínio de imunoexpressão na região basal/parabasal do revestimento epitelial dos CR (70,6%) e CO (95,0%), de acordo com a Tabela 2. Para a região de cápsula, foi constatada positividade de imunoexpressão em todos os casos de CR e CO (Figura 1 F e N).

Imunoexpressão de Bax

No revestimento epitelial e na cápsula fibrosa, foi constatada positividade para Bax em todos os casos de CR e CO analisados. Em relação às camadas do revestimento epitelial, o Bax evidenciou predomínio de expressão imunoistoquímica

em todas as camadas do epitélio de 17 CR (85,0%) e na região parabasal/superficial de 11 CO (55,0%), segundo a Tabela 2 e conforme visualização na figura 1 (C,G,K,O).

Imunoexpressão de caspase-3

Ao avaliar a imunoexpressão da caspase-3 no revestimento epitelial, houve positividade de imunoexpressão em 15 CR (75,0%) e 3 CO (15,0%). Ao avaliar os casos positivos no compartimento epitelial, os CR apresentaram maior imunoexpressão na região parabasal/superficial (46,7%) e basal/parabasal em CO (66,7%), conforme a Tabela 2 e figura 1 (D e L). Já a imunoexpressão em cápsula foi observada em todos os CR e em 15 CO (75,0%) (Figura 1 H e P).

Tabela 2 - Distribuição dos casos de CR e CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial.

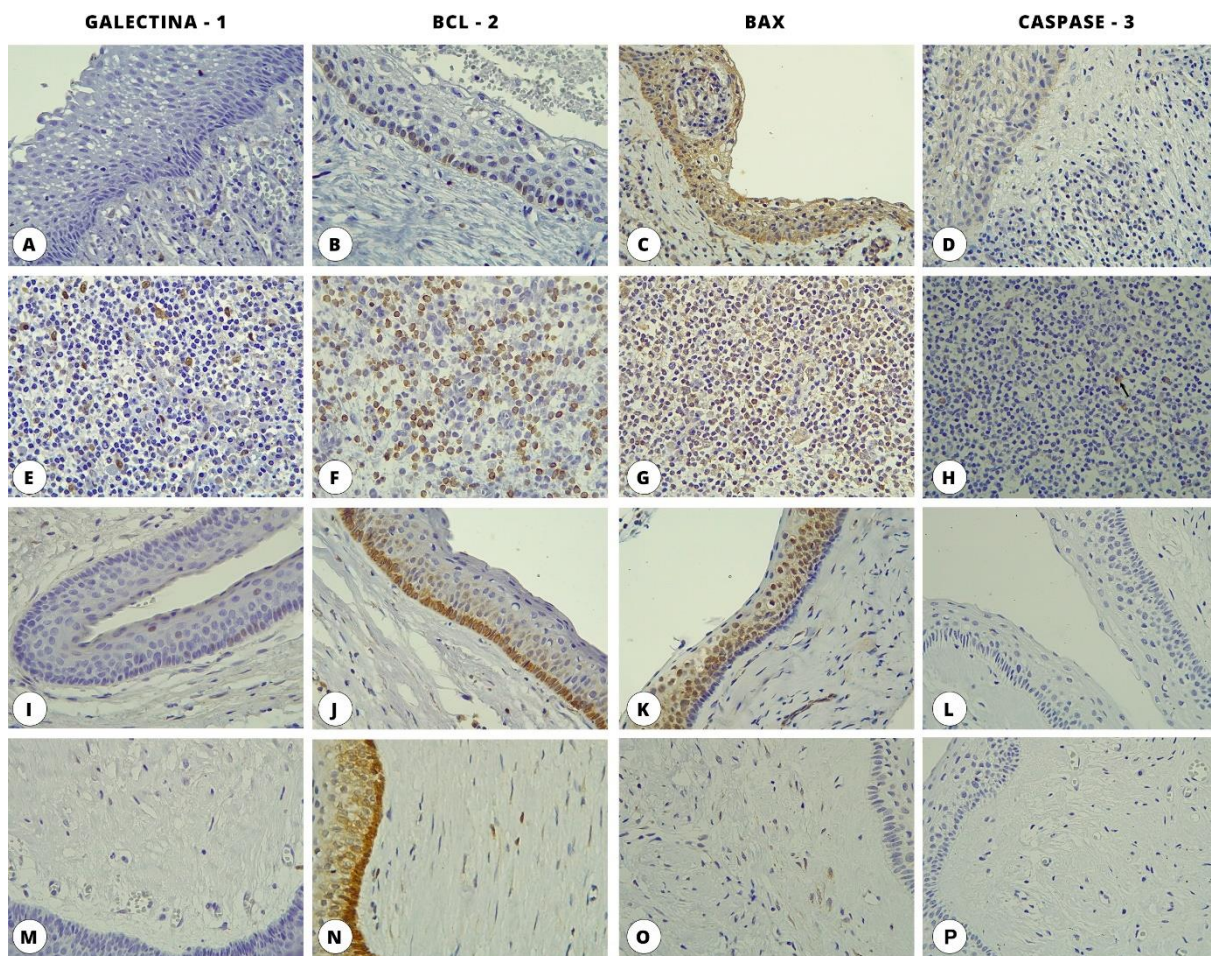
Proteínas/ predomínio	Grupos	
	CR	CO
	n (%)	n (%)
<i>Galectina-1</i>		
Basal/parabasal	2 (22,2%)	14 (93,3%)
Parabasal/superficial	7 (77,8%)	0 (0,0%)
Superficial	0 (0,0%)	1 (6,7%)
Todas as camadas	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Bcl-2</i>		
Basal/parabasal	12 (70,6%)	19 (95,0%)
Parabasal/superficial	1 (5,9%)	1 (5,0%)
Superficial	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Todas as camadas	4 (23,5%)	0 (0,0%)
<i>Bax</i>		

Basal/parabasal	2 (10,0%)	2 (10,0%)
Parabasal/superficial	1 (5,0%)	11 (55,0%)
Superficial	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Todas as camadas	17 (85,0%)	7 (35,0%)
<i>Caspase-3</i>		
Basal/parabasal	1 (6,7%)	2 (66,7%)
Parabasal/superficial	7 (46,7%)	1 (33,3%)
Superficial	3 (20,0%)	0 (0,0%)
Todas as camadas	4 (26,7%)	0 (0,0%)

*Os percentuais foram calculados nos casos que apresentaram imunorreatividade.

Fonte: o autor, 2021.

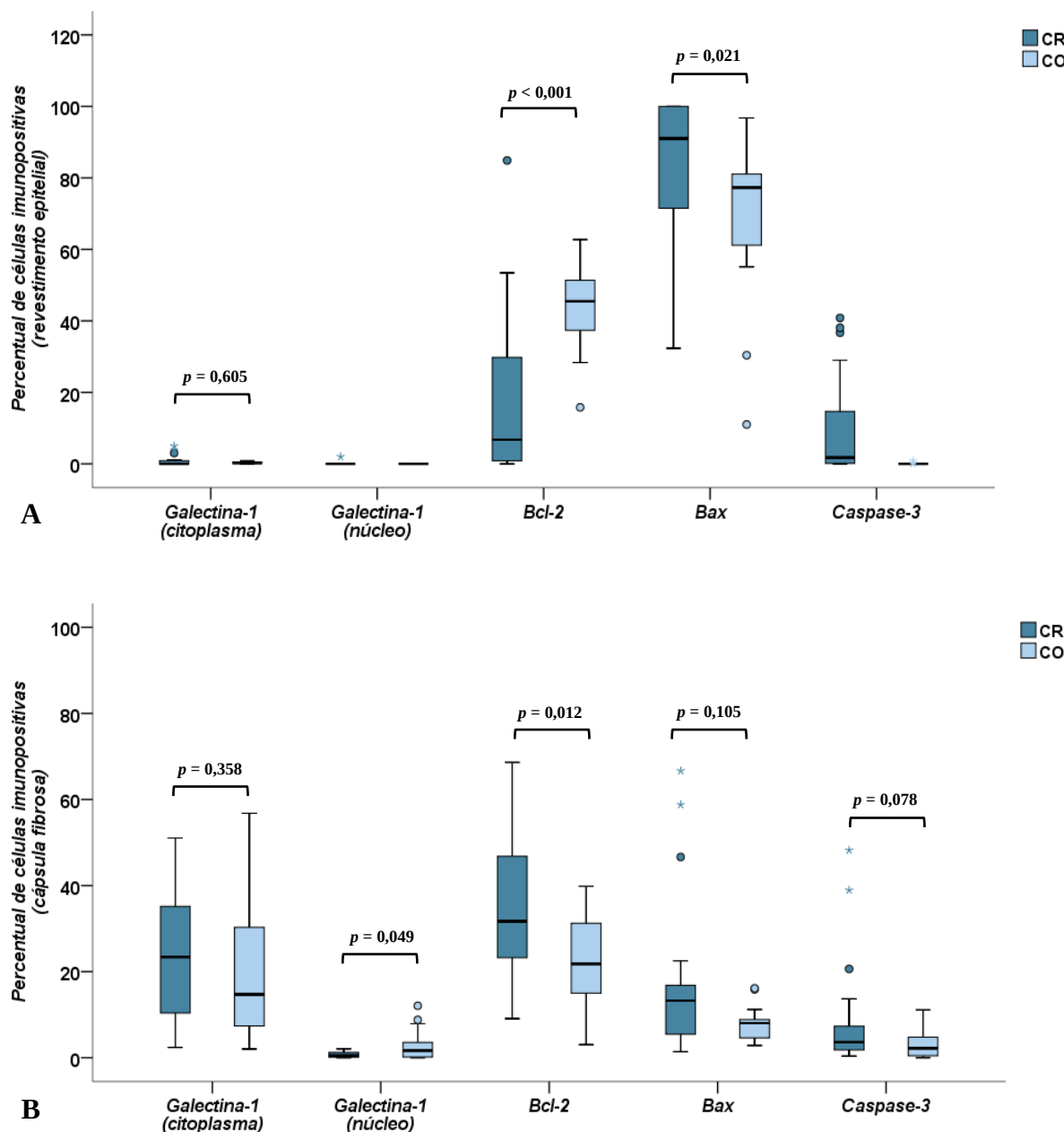
Figura 1 - Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da galectina-1, Bcl-2, Bax e Caspase-3. (A) Expressão da galectina-1 no epitélio de revestimento de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (B) Expressão do Bcl-2 no revestimento epitelial de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (C) Intensa imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (D) Expressão da caspase-3 epitélio de revestimento de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (E) Expressão citoplasmática/membranar da galectina-1 no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (F) Imunoexpressão do Bcl-2 no infiltrado inflamatório da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (G) Elevada expressão do Bax no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (H) Baixa imunoexpressão da caspase-3 (seta) no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (I) Imunoexpressão da galectina-1 no revestimento epitelial de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (J) Padrão de imunoexpressão do Bcl-2 na camada basal/parabasal do epitélio de revestimento de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (K) Imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CO, com destaque para a expressão parabasal/superficial (*EnVisionTM Flex*, x400). (L) Ausência de imunoexpressão da caspase-3 no revestimento epitelial de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (M) Baixa imunoexpressão da galectina-1 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (O) Expressão imunoistoquímica do Bax na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (O) Expressão do Bax na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (P) Ausência de imunoexpressão da caspase-3 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400).



Fonte: o autor, 2021

A avaliação dos percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos CR e CO em relação ao revestimento epitelial evidenciou diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão do Bcl-2 e do Bax ($p < 0,05$). Para a cápsula fibrosa, diferenças estatisticamente significativas foram observadas na expressão nuclear da galectina-1 e do Bcl-2 ($p < 0,05$), conforme ilustra a figura 2A-B.

Figura 2 - Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR e CO.

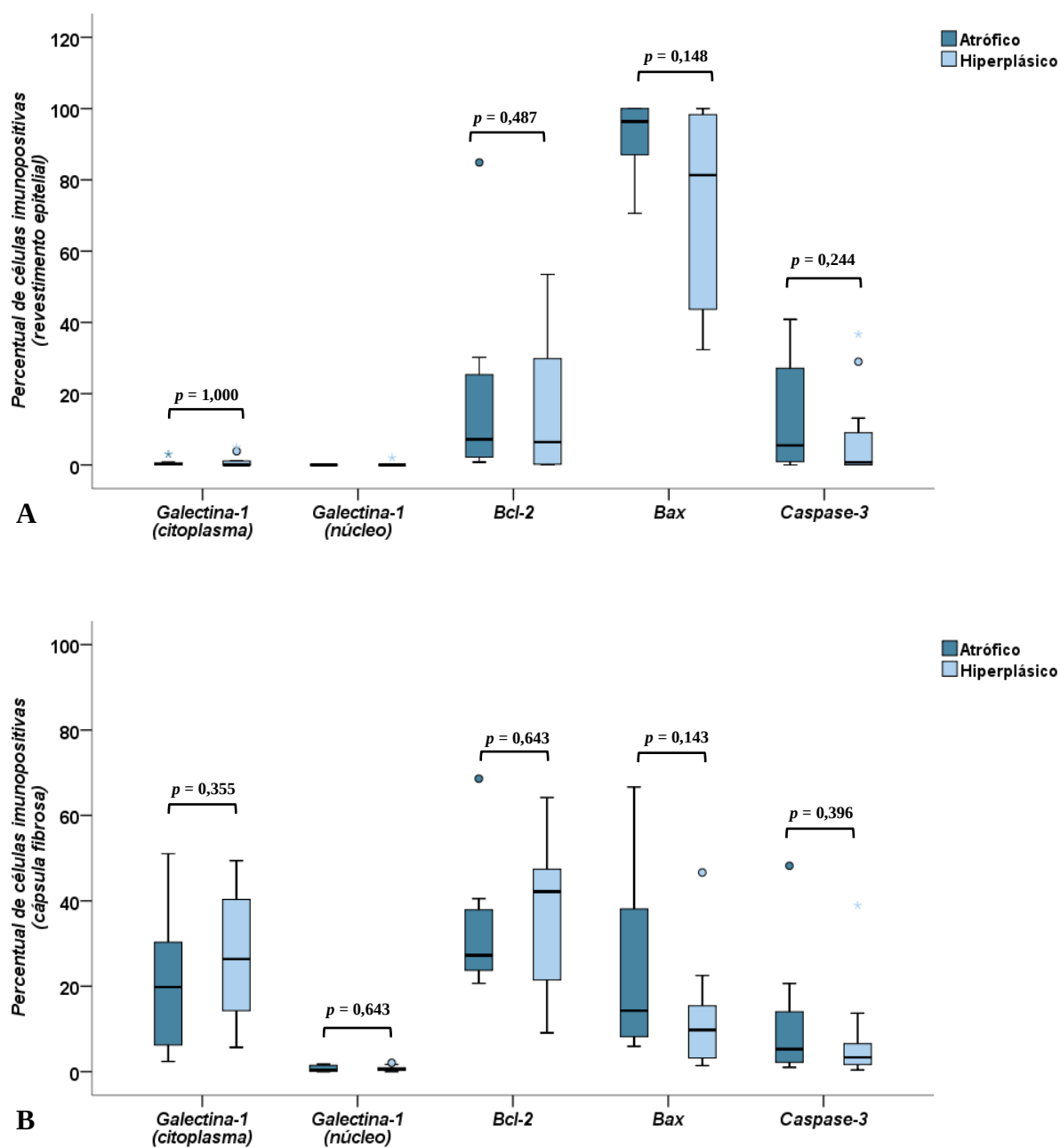


Fonte: o autor, 2021

Ao analisar a imunoexpressão da galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos CR, de acordo com os padrões morfológicos, foi observado que o revestimento epitelial atrófico dos CR apresentou, quantitativamente, os maiores percentuais de expressão do Bax. Já a cápsula fibrosa evidenciou, quantitativamente, uma maior expressão de

Bcl-2 em CR com revestimento epitelial hiperplásico, entretanto, associações estatísticas não foram identificadas ($p > 0,05$) (Figura 3A-B).

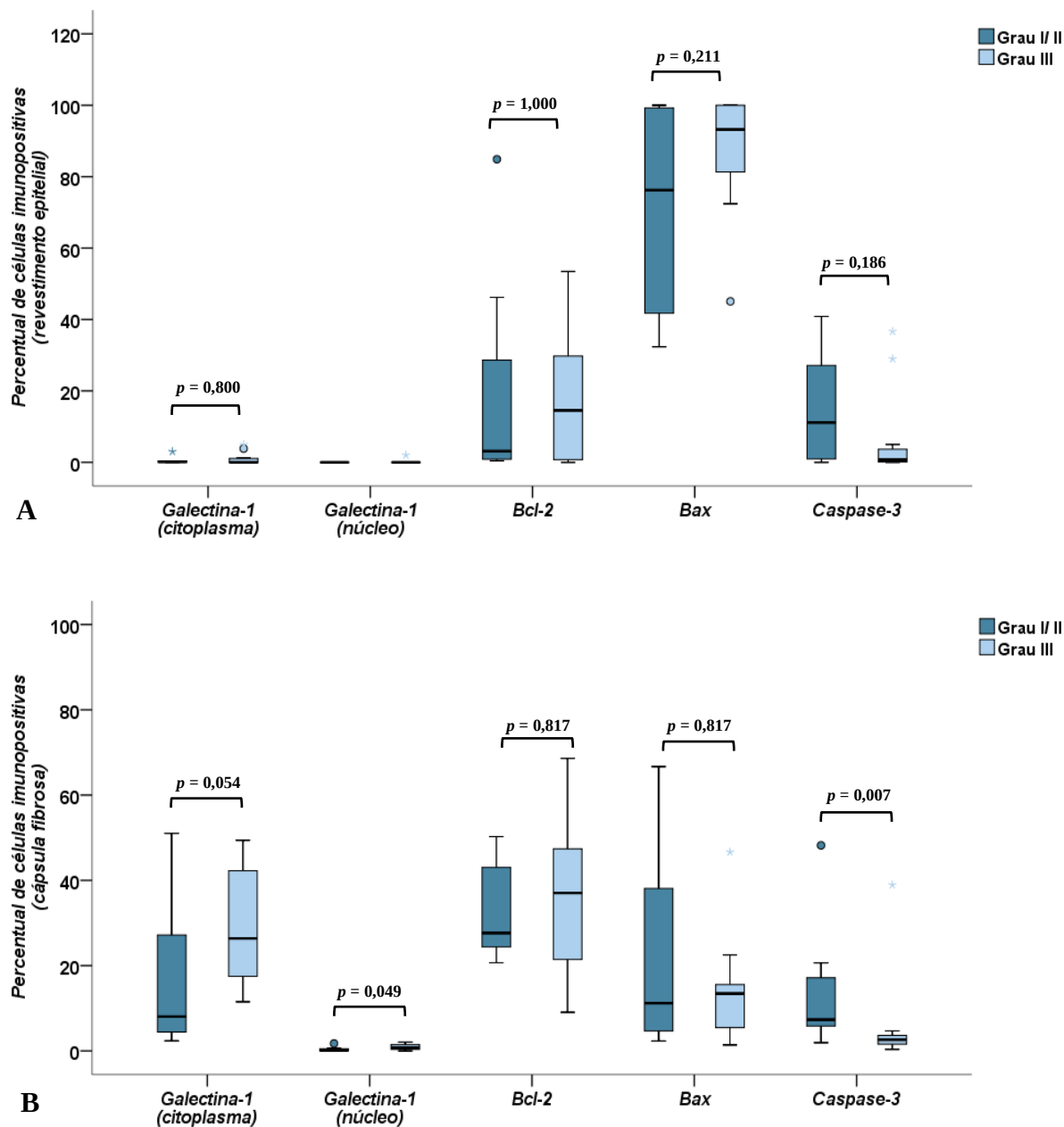
Figura 3 - Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR de acordo com o padrão do revestimento epitelial.



Fonte: o autor, 2021

A análise dos percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos CR, em relação à intensidade do infiltrado inflamatório revelou que CR com infiltrado inflamatório intenso expressaram grandes quantidades de Bax no revestimento epitelial, contudo, sem associações estatísticas ($p > 0,05$). Na cápsula fibrosa, o Bcl-2 apresentou uma maior expressão neste componente na presença de infiltrado inflamatório intenso. Associações estatísticas foram identificadas nas imunoexpressões da galectina-1 (nuclear) e da caspase-3 ($p < 0,05$) (Figura 4 A-B).

Figura 4 - Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório.



Fonte: o autor, 2021

4 CONCLUSÃO

Os resultados da presente pesquisa revelaram que há evidências da participação da apoptose na patogênese dos CR e CO de diferentes formas. Desse modo, a imunoexpressão dos marcadores de morte celular programada podem influenciar o comportamento de CR e CO, onde:

- A imunoexpressão da galectina-1 no infiltrado inflamatório intenso de CR sugere sua participação na regulação dos mecanismos das células inflamatórias.
- A imunoexpressão do Bcl-2 no revestimento epitelial de CR e CO sugere uma atuação semelhante, porém com intensidades diferentes para as duas lesões, onde esta proteína teria participação na manutenção da camada de revestimento.
- O padrão de expressão do Bax no epitélio de revestimento de CR ser maior do que em CO sugere sua atuação nos mecanismos de apoptose desta referida camada.
- A maior expressão imunoistoquímica da caspase-3 na cápsula fibrosa de CR sugere que esta cisteína atue na diminuição do infiltrado inflamatório destas lesões.

5 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À APOPTOSE EM CISTOS RADICULARES E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS

INTRODUÇÃO

Os cistos odontogênicos correspondem a um dos grupos de lesões mais comuns dos ossos gnáticos e se originam de diferentes remanescentes epiteliais odontogênicos (1). Dentre estas lesões, os cistos radiculares (CR) são considerados os cistos odontogênicos de origem inflamatória mais comuns, cuja etiopatogênese está associada à proliferação de remanescentes epiteliais após a necrose pulpar (2, 3). Já os ceratocistos odontogênicos (CO) são lesões císticas que se originam de restos da lâmina dentária. Estas lesões apresentam um revestimento epitelial escamoso estratificado paraqueratinizado e podem apresentar comportamento potencialmente agressivo ou infiltrativo (2, 4).

O crescimento e o desenvolvimento são processos essenciais para o sustento dos organismos, e a proliferação e a morte celular desempenham um papel importante para o desenvolvimento dos tecidos (5 - 7). Nesse contexto, o Bcl-2 e o Bax são considerados os mais importantes reguladores da apoptose e seus níveis relativos determinam o destino das células, onde o Bax é uma proteína pró-apoptótica antagonista de Bcl-2 (5). Adicionalmente, a morte celular programada envolve a ativação de um grupo de cisteínas proteases denominadas caspases, as quais, através de uma complexa cascata de eventos, estimulam a morte celular. Dentre estas, a caspase-3 é apontada como a marca registrada da apoptose e determinante para a morte celular (8, 9).

Galectinas são uma família de proteínas que podem ligar-se especificamente a β -galactosídeos. Essas proteínas têm múltiplas funções e podem ser expressas nos compartimentos intracelulares e extracelulares. Dentre estas proteínas, a galectina-1 tem sido associada à regulação da proliferação celular, apoptose e angiogênese através da sua forma dimérica. (10, 11). De acordo com Brinchmann, Patel e Iversen (12), a homeostase das células T pode ser regulada pela galectina-1 através da inibição da expansão clonal e indução da apoptose.

Embora a etiopatogênese de cistos odontogênicos possam diferir em cistos inflamatórios e de desenvolvimento, estas lesões apresentam uma característica comum, que é a formação cística (13). Nos CR, efeitos apoptóticos podem estar

influenciados pelo infiltrado inflamatório presente na cápsula, interferindo nos mecanismos de renovação celular, proliferação e controle da espessura do revestimento epitelial (14). Segundo Slusarenko Silva e Naclério-Homem (15) o efeito anti-apoptótico desempenha um importante papel no crescimento de CO, contudo ainda não há subsídios importantes para afirmar que a expressão elevada de Bcl-2 esteja associada à agressividade destas lesões.

Assim como a etiopatogênese das lesões odontogênicas, o papel do tecido epitelial e conjuntivo sobre os processos biológicos envolvidos no desenvolvimento dos cistos odontogênicos ainda não foram completamente elucidados (13, 16, 17). Nesse contexto, o presente estudo objetivou identificar, por meio de imunoistoquímica, a participação da galectina-1 nos mecanismos de apoptose em lesões odontogênicas císticas de origem inflamatória e de desenvolvimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da amostra

Amostras teciduais de 20 CR e 20 CO provenientes dos arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral localizados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) campus Recife (PE), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) campus Natal (RN) e da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) campus Campina Grande (PB), foram selecionadas aleatoriamente para este estudo. Os CR submetidos à tratamento endodôntico prévio e os CO tratados por descompressão ou marsupialização, associados à síndrome do carcinoma nevoide de células basais, bem como os casos relatados como recidivantes ou com inflamação secundária foram excluídos da amostra. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (número de protocolo: 43884721.1.0000.5208).

Dentre os CR que compuseram a amostra, 12 casos (60,0%) foram diagnosticados em mulheres e 8 em homens (40,0%). A idade variou de 13 a 75 anos, com média de 36,2 ($\pm$ 16,7) anos. Dentre estas lesões, 16 casos (80,0%) estavam localizados em maxila e 4 (20,0%) em mandíbula. Para os CO, 15 casos (75,0%) foram diagnosticados em mulheres e 5 (20,0%), em homens. A idade variou de 8 a 69

anos, com média de 34,1 ($\pm$ 19,4) anos. Dentre estes, 16 CO (80,0%) estavam localizados em mandíbula e 4 (20,0%), em maxila.

Análise Morfológica

Para o estudo morfológico, cortes com 5 μ m de espessura foram submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), um examinador previamente treinado para realizar a análise. A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com critérios de Peixoto et al. (18), adaptados do estudo de Tsai et al. (19). A partir da porção luminal dos CR em direção à periferia, foi considerado 1 campo microscópico, sob o aumento de 200x. Os espécimes cujo infiltrado inflamatório se apresentaram restritos à um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I (leve infiltrado), as lesões com células inflamatórias presentes entre um e dois terços foram definidas como de grau II (moderado infiltrado) e as lesões que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços foram categorizadas como de grau III (intenso infiltrado).

O revestimento epitelial foi analisado de acordo com metodologia proposta por Moreira et al. (20). Com base no padrão predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os CR que apresentaram em sua maior extensão o revestimento epitelial constituído por 2 a 10 camadas de células de espessura, e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial plana. Adicionalmente, foram considerados como hiperplásicos, os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial arciforme. Para a avaliação das camadas constituintes do epitélio, foi utilizada uma adaptação da classificação proposta por Leonardi et al. (21), de acordo com a área de predomínio de imureatividade para as proteínas avaliadas no revestimento epitelial, onde os casos foram classificados em: imunomarcção em camada basal/parabasal, imunomarcção em camada parabasal/superficial, imunomarcção em camada superficial ou imunomarcção em toda a extensão do revestimento.

Método Imunoistoquímico

O material fixado em formol e embocado em parafina foi submetido à cortes com 3µm de espessura e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriethoxysilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os cortes histológicos foram submetidos ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Envision Flex+, Dako, Agilent, Santa Clara, CA, EUA), utilizando anticorpos monoclonais anti-galectina-1, anti-bax, anti-bcl-2 e anti-caspase-3 (Tabela 1). A atividade da peroxidase foi visualizada através da imersão dos cortes teciduais em diaminobenzidina (Liquid DAB+, Dako, Carpinteria, CA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Posteriormente, os cortes teciduais foram contracolorados com hematoxilina de Mayer e montados com lamínula.

Para controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de tonsilas humanas. Para o controle negativo, no protocolo descrito anteriormente, o anticorpo primário foi substituído por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

Avaliação imunoistoquímica e análise estatística

A análise imunoistoquímica foi realizada por um examinador previamente treinado. Os cortes histológicos foram examinados por microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) sob aumento de 200x para identificação de 10 campos com maior imunorreatividade, sendo 5 campos para análise do revestimento epitelial e 5 para análise do tecido conjuntivo. As áreas foram fotomicrografadas (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) no aumento de 400x. As imagens obtidas foram transferidas para um computador, com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

O número de células positivas e negativas foi determinado em cada campo microscópico, permitindo o cálculo do percentual de células positivas e negativas em relação ao número total de células encontradas, adaptando assim, a técnica preconizada por Oliveira et al. (22). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 20.0, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA).

Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3, de acordo com os grupos de lesões e as características histopatológicas dos CR. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Análise morfológica

A análise do revestimento epitelial dos CR revelou que 12 casos (60,0%) apresentavam padrão epitelial hiperplásico e 8 casos (40,0%), padrão atrófico. Já o infiltrado inflamatório evidenciou que 12 casos (60,0%) apresentavam infiltrado inflamatório grau III, 6 casos (30,0%) grau II e apenas 2 casos (10,0%) com grau I.

Análise imunoistoquímica

A expressão nuclear de galectina-1 em revestimento epitelial foi constatada em apenas 1 caso de CR. Por sua vez, apenas 3 casos de CO apresentaram positividade para caspase-3 no revestimento epitelial. Dessa forma, os dados referentes às expressões dessas proteínas nesses compartimentos foram analisados apenas por meio de estatística descritiva.

Imunoexpressão de galectina-1

Ao avaliar o revestimento epitelial, foi constatada positividade de imunoexpressão citoplasmática para a galectina-1 em 9 casos de CR (45,0%) e em 15 casos de CO (75,0%) (Figura 1 A e I). A imunoexpressão da galectina-1 no núcleo das células do revestimento epitelial foi observada em apenas 1 (5,0%) CR e ausente nos CO. Em relação às camadas do revestimento epitelial, para os casos positivos, houve predomínio de expressão na camada parabasal/superficial dos CR (77,8%) e na região basal/parabasal dos CO (93,3%), conforme Tabela 2.

Para a região de cápsula, observou-se positividade de imunoexpressão citoplasmática da galectina-1 em todos os CR e CO analisados. Já a imunoexpressão nuclear da galectina-1 foi observada em 18 casos de CR (90,0%) e 15 casos de CO (75,0%) (Figura 1 E e M).

Imunoexpressão de Bcl-2

A avaliação da imunoexpressão do Bcl-2 no revestimento epitelial foi identificada em todos os CO (100,0%) e em 17 CR (85,0%), conforme figura 1 (B e J). Para os casos positivos, houve predomínio de imunoexpressão na região basal/parabasal do revestimento epitelial dos CR (70,6%) e CO (95,0%), de acordo com a Tabela 2. Para a região de cápsula, foi constatada positividade de imunoexpressão em todos os casos de CR e CO (Figura 1 F e N).

Imunoexpressão de Bax

A imunoexpressão do Bax foi constatada em todos os casos de CR e CO analisados. Ao avaliar o revestimento epitelial o Bax evidenciou predomínio de expressão imunoistoquímica em 17 casos de CR (85,0%) e em todos os CO (100%). Em relação às camadas do revestimento epitelial, o Bax evidenciou predomínio de expressão imunoistoquímica em todas as camadas do epitélio de 17 CR (85,0%) e na região parabasal/superficial de 11 CO (55,0%), segundo a Tabela 2. Na região de cápsula fibrosa, 100% dos CR e CO apresentaram imunoexpressão do Bax conforme visualização na figura 1 (C,G,K,O).

Imunoexpressão de caspase-3

Ao avaliar a imunoexpressão da caspase-3 no revestimento epitelial, houve positividade de imunoexpressão em 15 CR (75,0%) e 3 CO (15,0%). Ao avaliar os casos positivos no compartimento epitelial, os CR apresentaram maior imunoexpressão na região parabasal/superficial (46,7%) e basal/parabasal em CO (66,7%), conforme a Tabela 2 e figura 1 (D e L). Já a imunoexpressão em cápsula foi observada em todos os CR e em 15 CO (75,0%) (Figura 1 H e P).

A análise comparativa dos percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos CR e CO revelou que, em relação ao revestimento epitelial, diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão

do Bcl-2 e do Bax ($p < 0,05$) foram identificadas (Figura 2A). Para a cápsula fibrosa, a expressão nuclear da galectina-1 e do Bcl-2 ($p < 0,05$) também revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), conforme ilustra a Figura 2 (B).

A análise de imunoexpressão da galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos CR, de acordo com os padrões morfológicos, identificou que o revestimento epitelial atrófico dos CR apresentou, quantitativamente, os maiores percentuais de expressão do Bax (Figura 2C). Já a cápsula fibrosa evidenciou, quantitativamente, uma maior expressão de Bcl-2 em CR com revestimento epitelial hiperplásico, entretanto, associações estatísticas não foram identificadas ($p > 0,05$), conforme Figura 2 (D).

A avaliação das medianas dos percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos CR, em relação à intensidade do infiltrado inflamatório revelou que CR com infiltrado inflamatório intenso expressaram grandes quantidades de Bax no revestimento epitelial, contudo, sem associações estatísticas ($p > 0,05$) (Figura 2E). Na cápsula fibrosa, o Bcl-2 apresentou uma maior expressão neste componente na presença de infiltrado inflamatório intenso. Associações estatísticas foram identificadas nas imunoexpressões da galectina-1(nuclear) e da caspase-3 ($p < 0,05$), de acordo com a Figura 2 (F).

DISCUSSÃO

As diferenças de comportamento clínico observadas entre os cistos odontogênicos podem ser influenciadas pela proliferação e morte celular (7, 16, 23). Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de esclarecer a participação da apoptose no comportamento das lesões císticas de origem odontogênica (5, 6, 13, 14, 24, 26). No entanto, não está claro como as proteínas associadas a estes mecanismos se comportam nos diferentes compartimentos dos CR e CO.

As células que compõem o revestimento epitelial dos cistos odontogênicos podem apresentar diferentes funções de acordo com sua localização. Desse modo, a avaliação de expressão imunoistoquímica foi realizada de forma compartimentada no revestimento epitelial, dividido em: camada basal/parabasal, camada parabasal/superficial, camada superficial ou em toda a extensão do revestimento, conforme estudos anteriores (21, 27).

A análise dos percentuais de imunoexpressão evidenciaram uma elevada sinalização imunoistoquímica de Bcl-2 em CO e CR na camada basal/parabasal, onde

a expressão em CO revelou-se maior do que nos CR. Estes resultados ressaltam a necessidade de sobrevivência destas células da camada basal/parabasal dos CR e CO. Desse modo, a função do Bcl-2 nesta região para estas lesões seria semelhante, contudo, um pouco mais intensa nos CO. Portanto, o forte sinal de expressão de Bcl-2 no revestimento epitelial dos CR e CO justificaria a baixa quantidade de células em apoptose nesse compartimento, uma vez que, também foi observada uma baixa expressão de caspase-3 na mesma região.

Por meio de uma revisão sistemática da literatura, Slusarenko Silva e Naclério-Homem (15) avaliaram o efeito anti-apoptótico do Bcl-2 em CO, comparados aos cistos dentígeros e aos ameloblastomas. Os autores identificaram que a elevada expressão desta proteína na camada basal dos CO desempenha um importante papel no crescimento destas lesões. Estes achados corroboram os resultados de Kichi et al. (24), onde a imunoexpressão do Bcl-2 nos CO apresentou-se exclusivamente na camada basal do revestimento epitelial destas lesões, enquanto a apoptose foi identificada, pelo método TUNEL, apenas na camada superficial destas lesões. Segundo estes autores, o Bcl-2 inibe a apoptose em CO para facilitar proliferação celular na camada basal e a apoptose mantém a homeostase da espessura do epitélio de revestimento. Resultados semelhantes foram observados por Soluk Tekkeşin, Mutlu e Olgaç (5), os quais sugeriram que a elevada expressão de Bcl-2 em CO está relacionada à elevada atividade proliferativa e de sobrevivência, podendo esta ser uma das razões dos CO apresentarem comportamento clínico agressivo e elevada recorrência.

Todavia, os resultados do presente estudo sinalizam que esta restrição de expressão do Bcl-2 na camada germinativa destas lesões poderia ter outras relações, uma vez que a mesma não é identificada nas demais camadas constituintes do epitélio dos CO. Piattelli et al. (28) relataram uma forte positividade de Bcl-2 nas células da camada basal dos CO e uma expressão negativa de Bcl-2 nas células suprabasais. Estes achados foram sugestivos de uma regulação negativa de Bcl-2 durante o processo de diferenciação final das células. Segundo estes autores, esta positividade de Bcl-2 na camada basal de CO seria sugestiva de um controle anormal do ciclo celular, onde a elevada expressão dessa proteína anti-apoptótica proporcionaria um aumento na sobrevivência das células epiteliais. Este fato poderia induzir um padrão de crescimento mais agressivo. Achados semelhantes foram identificados no presente estudo. Adicionalmente, a predominância de expressão do Bax na camada

parabasal/superficial de CO enaltece a ausência de expressão desta proteína na camada basal do CO, o que corrobora a hipótese das células basais não ativarem os mecanismos de morte celular.

Ao considerar a natureza infiltrativa dos CO, sabe-se que as células do revestimento epitelial dos CO estão muito envolvidas em outros processos, tais como a remodelação de matriz extracelular (MEC), inclusive, de maneira mais significativa do que o epitélio de revestimento dos CR (29). Assim, é suposto que as células envolvidas com estes processos de remodelação podem expressar uma maior quantidade de Bcl-2 nos CO a fim de sobreviver para atuar nos processos de remodelação da MEC.

Sabe-se que os CR são lesões com atividade proliferativa elevada, onde os estímulos antigênicos provenientes do sistema de canais radiculares libera fatores de crescimento oriundos das células inflamatórias (16, 30, 31). Embora os RC não se apresentem clinicamente como grandes lesões expansíveis, estes mostram períodos de proliferação e quiescência (20). Segundo Cury et al. (32), os cistos revestidos por epitélio hiperplásico podem ser mais ativos do que lesões revestidas por epitélio atrófico, fato corroborado por estudos anteriores (18, 26). Desse modo, efeitos da apoptose podem atuar em CR a fim de regular o desenvolvimento destas lesões, uma vez que os resultados do presente estudo evidenciaram uma elevada expressão de Bax em todas as camadas do revestimento epitelial de CR atróficos.

Ao considerar uma maior expressão de Bcl-2 na cápsula fibrosa de CR com infiltrado inflamatório intenso, pode-se sugerir que a inflamação esteja influenciando a camada basal/parabasal dos CR a produzir Bcl-2. Adicionalmente, essa maior imunoexpressão seria decorrente do estímulo antigênico proveniente dos canais radiculares que provocaria a necessidade de manter uma maior quantidade de células inflamatórias na região. Ao compararem a imunoexpressão de marcadores da apoptose no epitélio e conjuntivo de CR, CO e Ameloblastomas, Soluk Tekkeşin, Mutlu e Olgaç (5) relataram que os reguladores apoptóticos indicaram um microambiente pró-apoptose tanto no epitélio quanto na cápsula dos CR, onde a imunoexpressão de Bcl-2 foi inferior (anti-apoptótica) e de Bax superior (pró-apoptótica). Porém, suposições a respeito da alta expressão de Bax comparadas às outras lesões não foram descritas por estes autores. Nesse contexto, explicações a respeito das funções do Bax nas demais camadas constituintes do epitélio de CO necessitam de maiores esclarecimentos. Os resultados do presente estudo demonstraram que a

imunoexpressão de Bcl-2 em CR atróficos e hiperplásicos foram bem semelhantes. Entretanto, apesar de ausência de associações estatísticas, elevadas imunoexpressões de Bax foram observadas, onde o padrão atrófico revelou imunoexpressões do Bax e da caspase-3 um pouco maiores do que nos CR de revestimento epitelial hiperplásico. Desse modo, o Bax poderia atuar estimulando a apoptose destas lesões. Assim, a ativação da sinalização de apoptose seria via Bax, e não por falta de expressão de Bcl-2.

A avaliação de imunoexpressão de marcadores da apoptose em CR realizada por Martins et al. (14) destacou que esse mecanismo foi mais evidente no epitélio de CR hiperplásicos. Segundo estes autores, a regulação da proliferação epitelial da camada basal é estimulada pelo aumento da concentração de infiltrado inflamatório na cápsula do tecido conjuntivo adjacente. Contudo, um estudo prévio de Loyola et al. (25) identificou que os CR com epitélio atrófico apresentaram maiores índices de apoptose em relação as lesões de epitélio hiperplásico, embora associações estatísticas não tenham sido relatadas.

A expressão de moléculas apoptóticas pertencentes à via extrínseca no revestimento epitelial dos cistos radiculares foram relatadas em estudos, onde a caspase-3 pode desempenhar um papel fundamental no comportamento dessas lesões (14, 26). A participação da caspase-3 está relacionada à efetivação da morte celular pela cascata apoptótica que envolve a ativação das caspases. Por ser classificada como uma caspase executora, a caspase-3 é considerada a marca registrada da apoptose (26). Os resultados do presente estudo descreveram, quantitativamente, uma maior expressão de caspase-3 em CR atróficos do que nos hiperplásicos, apesar da ausência de associações estatísticas. Contudo, associações estatísticas foram identificadas na expressão de caspase-3 na cápsula de CR com infiltrado inflamatório leve/moderado. Estes resultados sugerem que num momento de estímulo antigênico de menor intensidade, e por sinalização apoptótica via Bax, haveria uma redução do infiltrado inflamatório nos CR. Entretanto, estudos avaliando a participação da caspase-3 no infiltrado inflamatórios de CR não foram identificados até o momento.

A Galectina-1 tem múltiplas funções intracelulares e extracelulares, sendo expressas tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular (11). Na presença de estímulos pró-inflamatórios, ocorre uma elevada expressão de galectina-1 nas células endoteliais, sendo esta capaz de induzir a apoptose dos linfócitos T ativados

(33). Associações estatísticas não foram identificadas na imunoexpressão da galectina-1 nas lesões odontogênicas císticas, contudo, a avaliação dessa lectina no revestimento epitelial evidenciou um predomínio de imunoexpressão na camada parabasal/superficial de CR e na camada basal/parabasal de CO.

A expressão da galectina-1 tem sido extensivamente estudada em carcinomas de células escamosas (CCE) da cavidade oral e da região de cabeça e pescoço (34). Todavia, a participação da galectina-1 no revestimento epitelial de CO ainda necessita de maiores esclarecimentos. Ao verificar o local de expressão nos CO, sua baixa expressão nuclear e a ausência de estímulos inflamatórios, é sugerida a participação desta lectina na manutenção do revestimento epitelial. Porém, a elevada expressão imunoistoquímica na cápsula fibrosa de CR com revestimento epitelial hiperplásico e infiltrado inflamatório intenso sugere sua participação na regulação dos mecanismos imunoinflamatórios, corroborando estudo prévio (35).

A patogênese das lesões císticas odontogênicas depende da ativação de um complexa rede de moléculas que são determinantes para o desenvolvimento destas lesões. Nesse contexto, os resultados do presente estudo destacam a participação do Bcl-2 na manutenção do revestimento epitelial dos CO, a ativação da apoptose no revestimento epitelial de CR via Bax, uma atuação da caspase-3 na inflamação de CR e uma menor participação da galectina-1 no desenvolvimento destas lesões.

REFERENCIAS

1. Jabbarzadeh M, Hamblin MR, Pournaghi-Azar F, et al. Ki-67 expression as a diagnostic biomarker in odontogenic cysts and tumors: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2021;15(1):66-75.
2. Rajendra Santosh, AB. Odontogenic Cysts. *Dent Clin North Am*. 2020; 64(1):105-19.
3. Batista NMG, de Moraes ATL, Balbinot KM, et al. Immunohistochemical analysis of ADAMTS-1, versican and pEGFR expressions in periapical granuloma and radicular cyst. *BMC Oral Health*. 2021; 21(1):102.
4. Portes J, Cunha KSG, da Silva LE, et al. Computerized Evaluation of the Immunoexpression of Ki-67 Protein in Odontogenic Keratocyst and Dentigerous Cyst. *Head Neck Pathol*. 2020;14(3):598-605.
5. Soluk Tekkeşin M, Mutlu S, Olgaç V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg*. 2012;28(1):49-55.
6. Tenório JR, Santana T, Queiroz SI, et al. Apoptosis and cell cycle aberrations in epithelial odontogenic lesions: An evidence by the expression of p53, Bcl-2 and Bax. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018; 23(2):e120-e125.
7. Orikpete EV, Omoregie OF, Ojo MA. Proliferative and anti-apoptotic indices of unicystic ameloblastoma, odontogenic keratocyst, dentigerous cyst and radicular cyst. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020; 24(2):399.
8. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516.
9. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*. 2008; 44(3):200-4.
10. Shih TC, Fan Y, Kiss S, et al. Galectin-1 inhibition induces cell apoptosis through dual suppression of CXCR4 and Ras pathways in human malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro Oncol*. 2019; 21(11):1389-1400.
11. Zhang N, Peng F, Wang Y, et al. Shikonin induces colorectal carcinoma cells apoptosis and autophagy by targeting galectin-1/JNK signaling axis. *Int J Biol Sci*. 2020; 16(1):147-61.
12. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2018; 1(1):9186940.

13. Costa NMM, de Siqueira AS, Ribeiro ALR, et al. Role of HIF-1 α and CASPASE-3 in cystogenesis of odontogenic cysts and tumors. *Clin Oral Investig*. 2018;22(1):141-49.
14. Martins CA, Rivero ER, Dufloth RM, et al. Immunohistochemical detection of factors related to cellular proliferation and apoptosis in radicular and dentigerous cysts. *J Endod*. 2011; 37(1):36-9.
15. Slusarenko da Silva Y, Naclério-Homem MDG. A systematic review on the expression of bcl-2 in the nonsyndromic odontogenic keratocyst: should it be considered a cyst or a tumor? *Oral Maxillofac Surg*. 2020;24(3):277-82.
16. Bernardi L, Visioli F, Nör C, et al. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. *J Endod*. 2015; 41(12):1951-61.
17. Alsaegh MA, Altaie AM, Zhu S. Expression of keratin 15 in dentigerous cyst, odontogenic keratocyst and ameloblastoma. *Mol Clin Oncol*. 2019;10(3):377-81.
18. Peixoto RF, Pereira Jdos S, Nonaka CF, et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(9):1159-64.
19. Tsai CH, Weng SF, Yang LC, et al. Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator and type I plasminogen activator inhibitor in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:156-61.
20. Moreira PR, Santos DFM, Mantins RD, et al. CD57+ cells in radicular cyst. *Int Endod J* 2000; 33: 99-102.
21. Leonardi R, Matthews JB, Loreto C, et al. Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *Histol Histopathol* 2013; 28: 1175-84.
22. Oliveira RCM, Beghini M, Borges CRB, et al. Higher expression of galectin-3 and galectin-9 in periapical granulomas than in radicular cysts and an increased toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression are associated with reactivation of periapical inflammation. *J Endod* 2014; 40:199-203.
23. Basile JR, Castle JT, Redman RS. Immunohistochemical profile of the anti-apoptosis, apoptosis and proliferation markers Bcl-2, caspase-3, p53, and Ki-67 in botryoid odontogenic cysts compared to lateral periodontal cysts and gingival cysts of the adult. *Biotech Histochem*. 2021;96(4):263-68.
24. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T. et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-

- related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(5): 280-86.
25. Loyola AM, Cardoso SV, Lisa GS, et al. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. *Int Endod J.* 2005; 38(7):465-9.
 26. Loreto C, Galanti C, Leonardi R, et al. Possible role of apoptosis in the pathogenesis and clinical evolution of radicular cyst: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2013;46(7):642-8.
 27. Johann AC, Caldeira PC, Caliani MV, et al. Metallothionein in the radicular, dentigerous, orthokeratinized odontogenic cysts and in keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(3):270-6.
 28. Piattelli A, Fioroni M, Rubini C. Differentiation of odontogenic keratocysts from other odontogenic cysts by the expression of bcl-2 immunoreactivity. *Oral Oncol.* 1998; 34:404–407.
 29. Khot K, Deshmukh SB, Alex S. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous cyst and radicular cyst. *J Cancer Res Ther.* 2015;11(3):635-40.
 30. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod.* 2010;36(6):995-9.
 31. Weber M, Ries J, Büttner-Herold M, et al. Differences in Inflammation and Bone Resorption between Apical Granulomas, Radicular Cysts, and Dentigerous Cysts. *J Endod.* 2019;45(10):1200-1208.
 32. Cury VC, Sette PS, da Silva JV, et al. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod.* 1998;24(1):36-7
 33. Norling LV, Sampaio AL, Cooper D, Perretti M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J.* 2008;22(3):682-90.
 34. Salunkhe V, Mahajan A, Prakash N, Pradeep GL, Patil R, Gajdhar SK. Galectin-1 expression in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020;24(1):186.
 35. Brito LNS, de Lemos Almeida MMR, de Souza LB, Alves PM, Nonaka CFW, Godoy GP. Immunohistochemical Analysis of Galectins-1, -3, and -7 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. *J Endod.*

2018;44(5):728-733.

Tabela1 - Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectina 1, anti-bax, anti-bcl-2 e anti-caspase-3 clivada.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Galectina - 1	(C-45)	Santa Cruz Biotechnology	1:2500	Citrato pH 6,0 60 min <i>Steamer</i>	overnight
Bax	(2D2)	Scytek	1:400	Tris-EDTA pH 9,0 60 min <i>Steamer</i>	overnight
Bcl-2	(2D2)	Dako	1:1500	Tris-EDTA pH 9,0 60 min <i>Steamer</i>	overnight
Caspase-3 clivada	(5A1E)	Cell Signaling	1:1500	Tris-EDTA pH 9,0 60 min <i>Steamer</i>	overnight

Fonte: o autor, 2021

Tabela 2 - Distribuição dos casos de CR e CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial.

Proteínas/ predomínio	Grupos	
	CR	CO
	n (%)	n (%)
<i>Galectina-1</i>		
Basal/parabasal	2 (22,2%)	14 (93,3%)
Parabasal/superficial	7 (77,8%)	0 (0,0%)
Superficial	0 (0,0%)	1 (6,7%)
Todas as camadas	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Bcl-2</i>		
Basal/parabasal	12 (70,6%)	19 (95,0%)
Parabasal/superficial	1 (5,9%)	1 (5,0%)
Superficial	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Todas as camadas	4 (23,5%)	0 (0,0%)
<i>Bax</i>		
Basal/parabasal	2 (10,0%)	2 (10,0%)
Parabasal/superficial	1 (5,0%)	11 (55,0%)
Superficial	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Todas as camadas	17 (85,0%)	7 (35,0%)
<i>Caspase-3</i>		
Basal/parabasal	1 (6,7%)	2 (66,7%)
Parabasal/superficial	7 (46,7%)	1 (33,3%)
Superficial	3 (20,0%)	0 (0,0%)

Todas as camadas

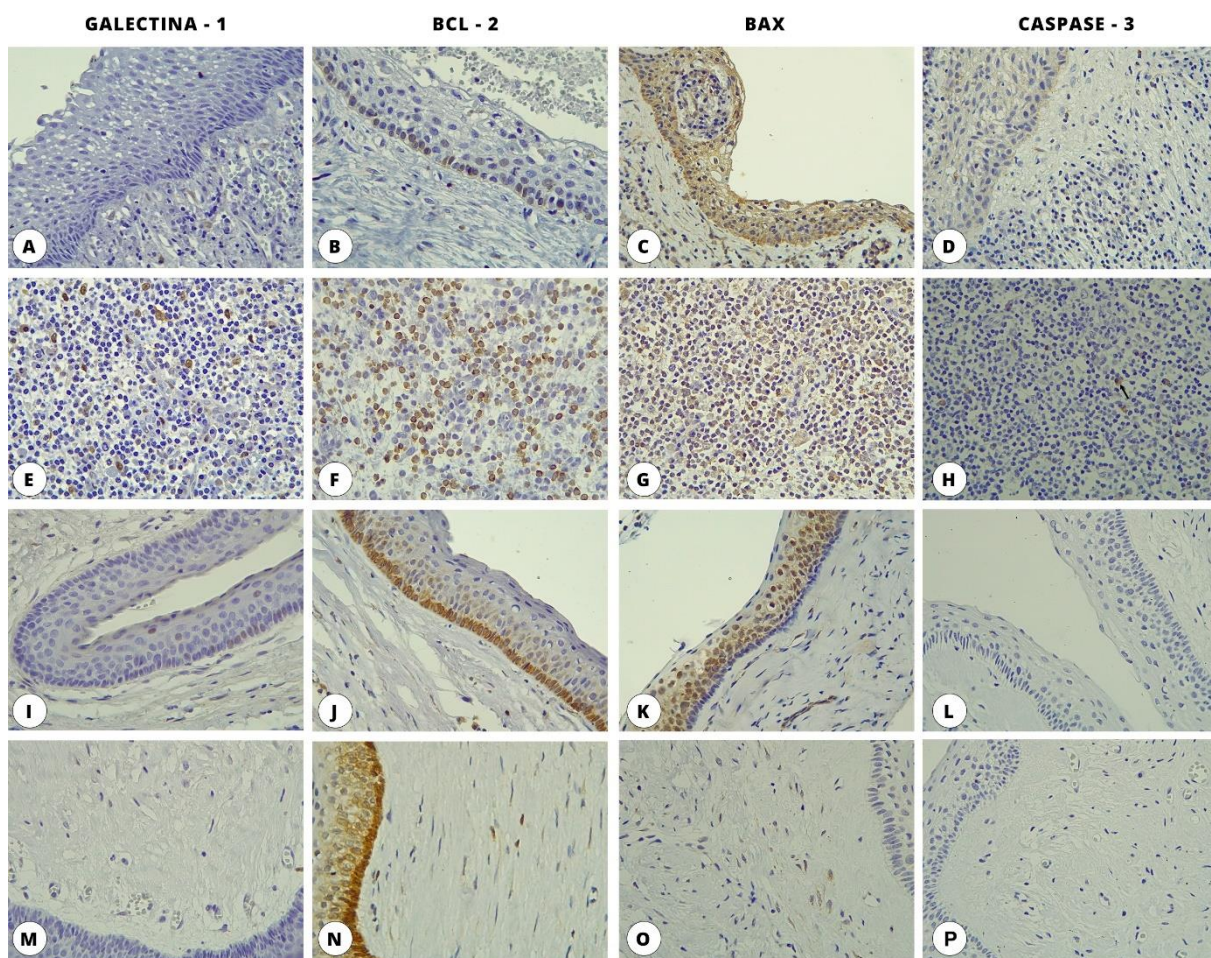
4 (26,7%)

0 (0,0%)

*Os percentuais foram calculados nos casos que apresentaram imunorreatividade.

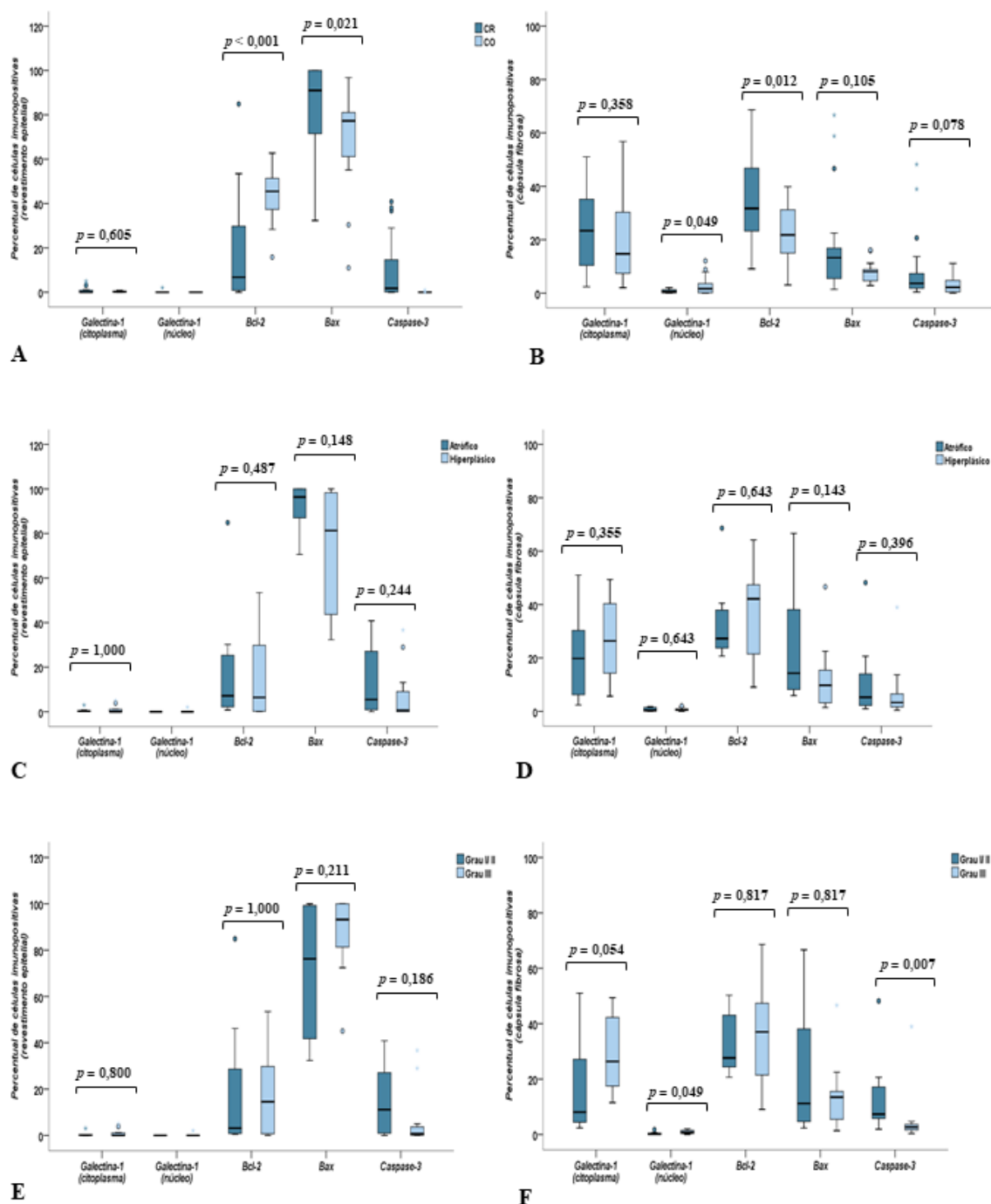
Fonte: o autor, 2021

Figura 1 - Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da galectina-1, Bcl-2, Bax e Caspase-3. (A) Ausência de expressão da galectina-1 no epitélio de revestimento de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (B) Expressão do Bcl-2 no revestimento epitelial de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (C) Intensa imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (D) Expressão da caspase-3 epitélio de revestimento de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (E) Expressão citoplasmática/membranar da galectina-1 no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (F) Imunoexpressão do Bcl-2 no infiltrado inflamatório da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (G) Elevada expressão do Bax no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (H) Baixa imunoexpressão da caspase-3 (seta) no infiltrado inflamatório intenso da cápsula fibrosa de CR (*EnVisionTM Flex*, x400). (I) Imunoexpressão da galectina-1 no revestimento epitelial de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (J) Padrão de imunoexpressão do Bcl-2 na camada basal/parabasal do epitélio de revestimento de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (K) Imunoexpressão do Bax no revestimento epitelial de CO, com destaque para a expressão parabasal/superficial (*EnVisionTM Flex*, x400). (L) Ausência de imunoexpressão da caspase-3 no revestimento epitelial de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (M) Baixa imunoexpressão da galectina-1 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (O) Expressão imunoistoquímica do Bax na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (N) Imunoexpressão do Bcl-2 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (O) Expressão do Bax na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400). (P) Ausência de imunoexpressão da caspase-3 na cápsula fibrosa de CO (*EnVisionTM Flex*, x400).



Fonte: o autor, 2021

Figura 2 - Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para galectina-1, Bcl-2, Bax e caspase-3 no revestimento epitelial (A) e na cápsula fibrosa (B) dos CR e CO. No revestimento epitelial (C) e na cápsula fibrosa (D) dos CR de acordo com o padrão do revestimento epitelial e no revestimento epitelial (E) e na cápsula fibrosa (F) dos CR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório.



Fonte: o autor, 2021

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os mecanismos imunoinflamatórios envolvidos na patogênese de lesões císticas odontogênicas, sejam elas de desenvolvimento ou de origem inflamatória, requerem a ativação de diferentes moléculas.

Desse modo, os resultados encontrados após o desenvolvimento desta pesquisa enaltecem a preponderante participação da proteína Bcl-2 na manutenção do epitélio de revestimento em CO. Adicionalmente, destaca-se a participação da apoptose no revestimento epitelial de CR, por meio da proteína Bax, e uma participação da galectina-1 no desenvolvimento, tanto de CO, quanto de CR. Todavia, mais estudos acerca destes mecanismos devem ser desenvolvidos a fim de se compreender as vias de desenvolvimento destas lesões.

REFERÊNCIAS

1. Rajendra Santosh, AB. Odontogenic Cysts. *Dent Clin North Am.* 2000; 64(1):105-19.
2. Daley TD, Wysocki GP, Pringle GA. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;77(3):276-80.
3. Grossmann SM, Machado VC, Xavier GM, Moura MD, Gomez RS, Aguiar MC, Mesquita RA. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(6):e35-41.
4. Shear M, Speight PM. Cysts of the oral and maxillofacial regions. 4 ed. Blackwell, Munksgaard, Oxford, 2007.
5. Jaafari-Ashkavandi Z, Akbari B. Clinicopathologic Study of Intra- Osseous Lesions of the Jaws in Southern Iranian Population. *J Dent (Shiraz).* 2017;18(4):259-264.
6. Menditti D, Laino L, Di Domenico M, Troiano G, Guglielmotti M, Sava S, Mezzogiorno A, Baldi A. Cysts and Pseudocysts of the Oral Cavity: Revision of the Literature and a New Proposed Classification. *In Vivo.* 2018;32(5):999-1007.
7. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, et al. World Health Organization classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.
8. Johnson NR, Savage NW, Kazoullis S, Batstone MD. A prospective epidemiological study for odontogenic and non-odontogenic lesions of the maxilla and mandible in Queensland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115(4):515-22.
9. Khosravi N, Razavi SM, Kowkabi M, Navabi AA. Demographic distribution of odontogenic cysts in Isfahan (Iran) over a 23-year period (1988-2010). *Dent Res J (Isfahan).* 2013;10(2):162-7.
10. Lo Muzio L, Mascitti M, Santarelli A, et al. Cystic lesions of the jaws: a retrospective clinicopathologic study of 2030 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2017;124(2):128-138.
11. Tamiolakis P, Thermos G, Tosios KI, Sklavounou-Andrikopoulou A. Demographic and Clinical Characteristics of 5294 Jaw Cysts: A Retrospective Study of 38 Years. *Head Neck Pathol.* 2019;13(4):587-596.
12. Jones AV, Franklin CD. An analysis of oral and maxillofacial pathology found in adults over a 30-year period. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(7):392-401.
13. Ochsenius G, Escobar E, Godoy L, Peñafiel C. Odontogenic cysts: analysis of 2,944 cases in Chile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(2):E85-91.

14. Sharifian MJ, Khalili M. Odontogenic cysts: a retrospective study of 1227 cases in an Iranian population from 1987 to 2007. *J Oral Sci.* 2011;53(3):361-7.
15. Jaeger F, de Noronha MS, Silva ML, et al. Prevalence profile of odontogenic cysts and tumors on Brazilian sample after the reclassification of odontogenic keratocyst. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(2):267-270.
16. Kammer PV, Mello FW, Rivero ERC. Comparative analysis between developmental and inflammatory odontogenic cysts: retrospective study and literature review. *Oral Maxillofac Surg.* 2020;24(1):73-84.
17. Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J Investig Clin Dent.* 2014;5(1):9-14.
18. Bilodeau EA, Collins BM. Odontogenic Cysts and Neoplasms. *Surg Pathol Clin.* 2017;10(1):177-222
19. Sevekar S, Subhadra HN, Das V. Radicular cyst associated with primary molar: Surgical intervention and space management. *Indian J Dent Res.* 2018;29(6):836-839.
20. Scarfe WC, Toghiani S, Azevedo B. Imaging of Benign Odontogenic Lesions. *Radiol Clin North Am.* 2018;56(1):45-62.
21. Soluk Tekkeşin M, Mutlu S, Olgaç V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg.* 2012;28(1):49-55.
22. Tenório JR, Santana T, Queiroz SI, et al. Apoptosis and cell cycle aberrations in epithelial odontogenic lesions: An evidence by the expression of p53, Bcl-2 and Bax. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018;23(2):e120-e125.
23. Cummings RD, Liu FT, Vasta GR. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.469-480.
24. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002;23(6):313-20.
25. Alsaegh MA, Altaie AM, Zhu S. Expression of keratin 15 in dentigerous cyst, odontogenic keratocyst and ameloblastoma. *Mol Clin Oncol.* 2019;10(3):377-381.
26. Volkweis MR, Wagner JC, Gerhardt EL. Cistos e tumores odontogênicos - Um guia para o diagnóstico diferencial. *Jornal Brasileiro de Clínica Odontológica* 2002; 6(31): 36-42.
27. Rioux-Forker D, Deziel AC, Williams LS, Muzaffar AR. Odontogenic Cysts and Tumors. *Ann Plast Surg.* 2019;82(4):469-477.

28. Farias JG, Souza RCA, Hassam SF, et al. Epidemiological study of intraosseous lesions of the stomatognathic or maxillomandibular complex diagnosed by a Reference Centre in Brazil from 2006-2017. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2019;57(7):632-637.
29. Pereira LP, Nery AA. Planning, management and actions of men's health in the family health strategy. *Esc Anna Nery* 2014; 18(1):635-43.
30. Prockt AP, Schebela CR, Maito FD, Sant'Ana-Filho M, Rados PV. Odontogenic cysts: analysis of 680 cases in Brazil. *Head Neck Pathol*. 2008;2(3):150-6.
31. Avelar RL, Antunes AA, Carvalho RW, et al. Odontogenic cysts: a clinicopathological study of 507 cases. *J Oral Sci*. 2009;51(4):581-6.
32. Souza LB, Gordón-Núñez MA, Nonaka CF, et al. Odontogenic cysts: demographic profile in a Brazilian population over a 38-year period. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(4):e583-90.
33. Demirkol M, Ege B, Yanik S, Aras MH, Ay S. Clinicopathological study of jaw cysts in southeast region of Turkey. *Eur J Dent*. 2014 Jan;8(1):107-111.
34. Martin LHC, Speight PM. Odontogenic cysts: an update, *Diagnostic Histopathology* 2007; 23(6): 260-65.
35. Kolari V, Rao HTA, Thomas T. Maxillary and mandibular unusually large radicular cyst: A rare case report. *Natl J Maxillofac Surg*. 2019;10(2):270-273.
36. Kadam NS, Ataide Ide N, Raghava P, et al. Management of large radicular cyst by conservative surgical approach: a case report. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(2):239-41
37. Shanti RM, Alawi F, Lee SM, et al. Multidisciplinary approaches to odontogenic lesions. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020;28(1):36-45.
38. Ten Cate AR. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972;34(6):956-64.
39. Torabinejad M. The rôle of immunological reactions in apical cyst formation and the fate of epithelial cells after root canal therapy: a theory. *Int J Oral Surg*. 1983;12(1):14-22.
40. García CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(8):E585-90.
41. Aparna M, Chakravarthy A, Acharya SR, Radhakrishnan R. A clinical report demonstrating the significance of distinguishing a nasopalatine duct cyst from a radicular cyst. *BMJ Case Rep*. 2014; 2014:bcr2013200329.

42. Tsesis I, Krepel G, Koren T, Rosen E, Kfir A. Accuracy for diagnosis of periapical cystic lesions. *Sci Rep.* 2020;10(1):14155.
43. Lizio G, Salizzoni E, Coe M, et al. Differential diagnosis between a granuloma and radicular cyst: effectiveness of magnetic resonance imaging. *Int Endod J.* 2018;51(10):1077-1087.
44. Beconsall-Ryan K, Tong D, Love RM. Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis. *Int Endod J.* 2010;43(10):859-65.
45. Kolari V, Rao HTA, Thomas T. Maxillary and mandibular unusually large radicular cyst: A rare case report. *Natl J Maxillofac Surg.* 2019;10(2):270-273.
46. Cury VC, Sette PS, da Silva JV, de Araújo VC, Gomez RS. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod.* 1998;24(1):36-7.
47. Moreira PR, Santos DF, Martins RD, Gomez RS. CD57+ cells in radicular cyst. *Int Endod J.* 2000;33(2):99-102.
48. Bernardi L, Visioli F, Nör C, Rados PV. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. *J Endod.* 2015;41(12):1951-61.
49. Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod.* 2014;40(2):155-63.
50. Leonardi R, Caltabiano M, Pagano M, Pezzuto V, Loreto C, Palestro G. Detection of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor in periapical lesions. *J Endod.* 2003;29(3):180-3.
51. Ihan Hren N, Ihan A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2009;54(2):156-61.
52. Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, et al. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(3):250-6.
53. Leonardi R, Perrotta RE, Loreto C, et al. Toll-like receptor 4 expression in the epithelium of inflammatory periapical lesions. An immunohistochemical study. *Eur J Histochem.* 2015;59(4):2547.
54. Silva LABD, Sá MAR, Melo RA, et al. Analysis of CD57+ natural killer cells and CD8+ T lymphocytes in periapical granulomas and radicular cysts. *Braz Oral Res.* 2017;31:e106.
55. Yu J, Liu M, Zhu L, et al. The Expression of Interferon Regulatory Factor 8 in Human Periapical Lesions. *J Endod.* 2018;44(8):1276-1282.
56. Bianco BCF, Sperandio FF, Hanemann JAC, Pereira AAC. New WHO odontogenic tumor classification: impact on prevalence in a population. *J Appl Oral Sci.* 2019;28:e20190067.

57. Pindborg J, Kramer I. WHO international histological classification of tumours. histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts and allied lesions. Geneva, 1971.
58. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. A commentary on the Second Edition. *Cancer*. 1992 Dec 15;70(12):2988-94.
59. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours, 3th edn. IARC Press, Lyon, 2005.
60. Madras J, Lapointe H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *Tex Dent J*. 2008;125(5):446-54.
61. Bhargava D, Deshpande A, Pogrel MA. Keratocystic odontogenic tumour (KCOT)-a cyst to a tumour. *Oral Maxillofac Surg*. 2012;16(2):163-70.
62. Levanat S, Pavelić B, Crnić I, et al. Involvement of PTCH gene in various noninflammatory cysts. *J Mol Med (Berl)*. 2000;78(3):140-6.
63. Pavelić B, Levanat S, Crnić I, et al. PTCH gene altered in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*. 2001;30(9):569-76.
64. Borghesi A, Nardi C, Giannitto C, et al. Odontogenic keratocyst: imaging features of a benign lesion with an aggressive behaviour. *Insights Imaging*. 2018;9(5):883-897.
65. Khan AA, Qahtani SA, Dawasaz AA, et al. Management of an extensive odontogenic keratocyst: A rare case report with 10-year follow-up. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(51):e17987.
66. Silva LP, Serpa MS, Sobral APV, et al. A retrospective multicentre study of cystic lesions and odontogenic tumours in older people. *Gerodontology*. 2018;35(4):325-332.
67. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(5):280-6.
68. Kaplan I, Hirshberg A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. *Oral Oncol*. 2004;40(10):985-91.
69. Sreedhar G, Raju MV, Metta KK, et al. Immunohistochemical analysis of factors related to apoptosis and cellular proliferation in relation to inflammation in dentigerous and odontogenic keratocyst. *J Nat Sci Biol Med*. 2014;5(1):112-5.
70. Ghafouri-Fard S, Atarbashi-Moghadam S, Taheri M. Genetic factors in the pathogenesis of ameloblastoma, dentigerous cyst and odontogenic keratocyst. *Gene*. 2021;771:145369.

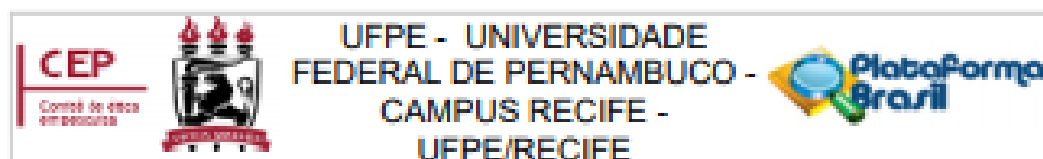
71. Orikpete EV, Omoregie OF, Ojo MA. Proliferative and anti-apoptotic indices of unicystic ameloblastoma, odontogenic keratocyst, dentigerous cyst and radicular cyst. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020;24(2):399.
72. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11(2):95-103.
73. Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(1):46-52.
74. Leone A, Uzzo ML, Rappa F, et al. Immunohistochemical expression of apoptotic factors, cytokeratins, and metalloproteinase-9 in periapical and epithelialized gingival lesions. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012;50(4):497-503.
75. Mateus GC, Lanza GH, de Moura PH, et al. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(11):E697-702.
76. Amaral FR, Mateus GC, Bonisson LA, et al. Cell proliferation and apoptosis in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *Braz Dent J.* 2012;23(2):91-6.
77. Loreto C, Galanti C, Leonardi R, et al. Possible role of apoptosis in the pathogenesis and clinical evolution of radicular cyst: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2013;46(7):642-8.
78. Martins CA, Rivero ER, Dufloth RM, et al. Immunohistochemical detection of factors related to cellular proliferation and apoptosis in radicular and dentigerous cysts. *J Endod.* 2011;37(1):36-9.
79. Rangiani A, Motahhary P. Evaluation of bax and bcl-2 expression in odontogenic keratocysts and orthokeratinized odontogenic cysts: A comparison of two cysts. *Oral Oncol.* 2009;45(7):e41-4.
80. Slusarenko da Silva Y, Naclério-Homem MDG. A systematic review on the expression of bcl-2 in the nonsyndromic odontogenic keratocyst: should it be considered a cyst or a tumor? *Oral Maxillofac Surg.* 2020;24(3):277-282.
81. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644(2-3):133-47.
82. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001;15(22):2922-33.
83. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

84. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):E255-63.
85. Park JB, Lee JK, Park SJ, et al. Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(6):1338-42.
86. Costa NMM, de Siqueira AS, Ribeiro ALR, et al. Role of HIF-1 α and CASPASE-3 in cystogenesis of odontogenic cysts and tumors. *Clin Oral Investig.* 2018;22(1):141-149.
87. Basile JR, Castle JT, Redman RS. Immunohistochemical profile of the anti-apoptosis, apoptosis and proliferation markers Bcl-2, caspase-3, p53, and Ki-67 in botryoid odontogenic cysts compared to lateral periodontal cysts and gingival cysts of the adult. *Biotech Histochem.* 2021;96(4):263-268.
88. Loyola AM, Cardoso SV, Lisa GS, et al. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. *Int Endod J.* 2005 Jul;38(7):465-9.
89. Ayona D, Fournier PE, Henrissat B, Desnues B. Utilization of Galectins by Pathogens for Infection. *Front Immunol.* 2020;11:1877.
90. Zhang N, Peng F, Wang Y, et al. Shikonin induces colorectal carcinoma cells apoptosis and autophagy by targeting galectin-1/JNK signaling axis. *Int J Biol Sci.* 2020;16(1):147-161.
91. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):274-84.
92. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:9186940.
93. Jiang ZJ, Shen QH, Chen HY, et al. Galectin-1 gene silencing inhibits the activation and proliferation but induces the apoptosis of hepatic stellate cells from mice with liver fibrosis. *Int J Mol Med.* 2019;43(1):103-116.
94. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):263-73.
95. Fukumori T, Kanayama HO, Raz A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2007;10(3):101-8.
96. Wang WH, Lin CY, Chang MR, et al. The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;53(6):925-935.
97. Oliveira Rde C, Beghini M, Borges CR, et al. Higher expression of galectin-3 and galectin-9 in periapical granulomas than in radicular cysts and an increased toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression are associated with reactivation of periapical inflammation. *J Endod.* 2014;40(2):199-203.

98. Brito LNS, de Lemos Almeida MMR, de Souza LB, et al. Immunohistochemical Analysis of Galectins-1, -3, and -7 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. *J Endod*. 2018;44(5):728-733.
99. Johannes L, Jacob R, Leffler H. Galectins at a glance. *J Cell Sci*. 2018;131(9):jcs208884.
100. Shih TC, Fan Y, Kiss S, et al. Galectin-1 inhibition induces cell apoptosis through dual suppression of CXCR4 and Ras pathways in human malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro Oncol*. 2019;21(11):1389-1400.
101. Abu El-Asrar AM, Ahmad A, Allegaert E, et al. Galectin-1 studies in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 2020;98(1):e1-e12.
102. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 1995;378(6558):736-9.
103. Dhirapong A, Lleo A, Leung P, et al. The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmun Rev*. 2009;8(5):360-3.
104. Norling LV, Sampaio AL, Cooper D, Perretti M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J*. 2008;22(3):682-90.
105. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*. 2007;8(8):825-34.
106. Toscano MA, Campagna L, Molinero LL, et al. Nuclear factor (NF)- κ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Mol Immunol*. 2011;48(15-16):1940-9.
107. Tang D, Gao J, Wang S, et al. Apoptosis and anergy of T cell induced by pancreatic stellate cells-derived galectin-1 in pancreatic cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(7):5617-26.
108. Ge XN, Ha SG, Greenberg YG, et al. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(33):E4837-46.
109. Farhadi SA, Fettis MM, Liu R, Hudalla GA. A Synthetic Tetramer of Galectin-1 and Galectin-3 Amplifies Pro-apoptotic Signaling by Integrating the Activity of Both Galectins. *Front Chem*. 2020;7:898.
110. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod*. 2010;36(6):995-9.

111. Carvalho Fraga CA, Alves LR, de Sousa AA, et al. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod.* 2013;39(4):453-5.
112. Peixoto RF, Pereira JS, Nonaka CF, et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1159-64.
113. Leonardi R, Matthews JB, Loreto C, et al. Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *Histol Histopathol.* 2013;28(9):1175-84.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IMUNISTOQUÍMICA DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE POR MEIO DA GALECTINA-1 EM CISTOS ODONTOGÊNICOS DE ORIGEM INFLAMATÓRIA E CISTOS ODONTOGÊNICOS DE DESENVOLVIMENTO

Pesquisador: Livia Natália Sales Brito

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 43884721.1.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.784.499

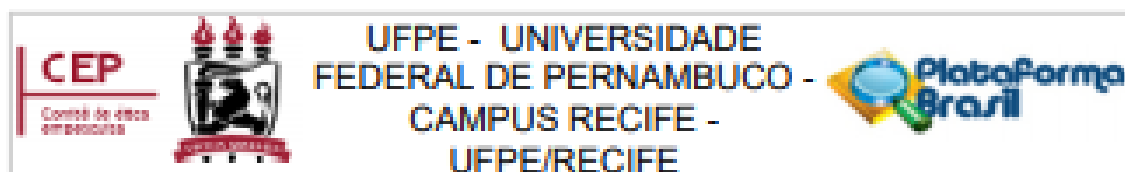
Apresentação do Projeto:

Trata-se de Projeto de Pesquisa referente à tese requerida para a obtenção do título de Doutor em Odontologia e área de concentração em Clínica Integrada pelo programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco de Livia Natália Sales Brito, sob a orientação do Prof. Gustavo Pina Godoy, tendo a coorientação do Prof. Cassiano Francisco Weege Nonaka.

Os cistos odontogênicos são considerados lesões ósteo-destrutivas que se originam de remanescentes epiteliais odontogênicos presentes nos tecidos bucais. De acordo com a mais recente classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (EL-NAGGAR et al., 2017), as lesões císticas devem ser categorizadas em cistos odontogênicos de origem inflamatória, cistos odontogênicos e não odontogênicos de desenvolvimento.

Ao considerar a avaliação dos mecanismos envolvidos na apoptose em lesões odontogênicas de origem inflamatória, entende-se a necessidade de avaliar, também, os mesmos mecanismos em lesões odontogênicas de desenvolvimento. Uma vez que algumas destas lesões podem compartilhar características clínicas, radiográficas e histopatológicas. Adicionalmente, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese dos cistos odontogênicos torna-se essencial, uma vez que algumas destas têm propensão à recorrência e comportamento agressivo. Assim, a elucidação dos caminhos bioquímicos e dos mecanismos que regulam a indução da

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2125-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.716.416

apoptose por meio da galectina-1 oferece uma oportunidade notável de manipular decisões de vida e morte celular. Segundo Rabinovich et al. (2002), estes conhecimentos podem abrir novas vias, não apenas no nível básico de pesquisa biomédica, mas também em diagnóstico de doenças, prognósticos e terapias clínicas.

O estudo será caracterizado como uma pesquisa em base de dados de caráter descritivo, retrospectivo e correlacional da expressão imunohistoquímica das proteínas Bax, Bcl-2, caspase -3, DR5 e galectina -1 em CR, CD e QO. Serão utilizados 60 casos de CR, CD e QO obtidos nos arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral localizados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) campus Recife (PE).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL:

O presente estudo objetiva avaliar a expressão imunohistoquímica do Bax, Bcl-2, caspase-3, DR5, e galectina -1 em CR, CD e QO, correlacionando-as a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo das lesões referidas, o padrão do revestimento epitelial e o local de imunexpressão.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Classificar morfológicamente os casos de CR, CD e QO quanto a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como o padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas;
- 2- Quantificar a expressão citoplasmática do Bax, Bcl-2, caspase -3, DR5 em CR, CD e QO;
- 3- Quantificar a expressão citoplasmática ou nuclear para a galectina -1 em CR, CD e QO;
- 4- Avaliar possíveis diferenças na imunexpressão de cada marcador imunohistoquímico com a intensidade do infiltrado inflamatório CR, CD e QO e com o padrão do revestimento epitelial;
- 5- Correlacionar a expressão de cada marcador imunohistoquímico com o tipo de lesão;
- 6- Correlacionar a expressão de cada marcador imunohistoquímico com o local de expressão, no compartimento celular (nuclear ou citoplasmático) e no compartimento tecidual (epitelial ou conjuntivo).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de dados será do tipo documental e acontecerá nos arquivos do Serviço de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), logo após será realizada imunohistoquímica das

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

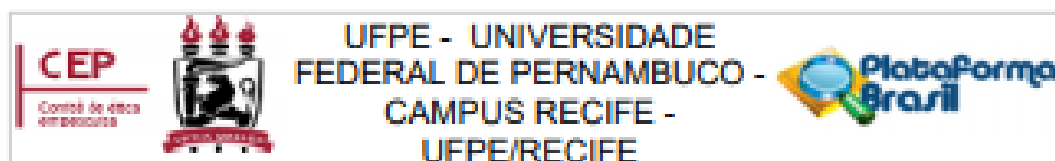
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81) 2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.764.488

lesões coletadas. Desse modo, os riscos para os sujeitos da pesquisa, ao utilizar dados secundários provenientes das fichas clínicas, são quebra de sigilo ou extravio de dados. Desse modo, a fim de amenizar esses riscos, o pesquisador se compromete na manutenção do sigilo e confidencialidade documental, assim como o manuseio adequado dos dados.

Benefícios:

Não há benefícios diretos para os sujeitos da pesquisa, porém, o conhecimento sobre o papel destes marcadores imunohistoquímicos na modulação da apoptose em lesões periapicais crônicas é importante uma vez que as mesmas apresentam uma alta ocorrência na população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta relevância uma vez que aborda o conhecimento de lesões crônicas com alta incidência na população.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão de acordo com as exigências do CEP.

Recomendações:

Recomendamos a inclusão de um grupo controle normal a fim de avaliar se os resultados obtidos no projeto estão alterados ou se correspondem a normalidade, mesmo que seja uma comparação entre os grupos apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem Pendências.

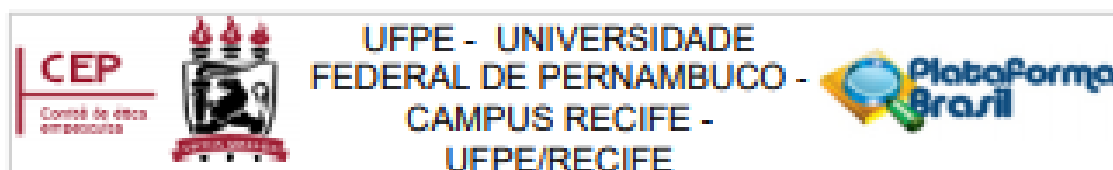
Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2128-8288 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.786.486

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do(a) pesquisador(a) assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1709138.pdf	18/08/2021 07:48:13		Aceito
Outros	financiamentocnpq.pdf	18/08/2021 07:47:35	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	cartarespostaaspendencias.pdf	18/08/2021 07:47:19	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado.docx	09/04/2021 08:21:18	Livia Natália Sales Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	solicitacaodedispensadeTCLE.pdf	01/03/2021 14:53:34	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	declaracaodematricula.pdf	26/02/2021 21:02:14	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	termodeautorizacaoousedaos.pdf	26/02/2021 21:02:01	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	autorizacaoainstitucional.pdf	26/02/2021 21:01:31	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	termodecompromissoeconfidencialidade.pdf	26/02/2021 21:00:02	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	lattescoorientador.pdf	26/02/2021 20:57:01	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	lattesorientador.pdf	26/02/2021 20:56:25	Livia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	lattespesquisador.pdf	26/02/2021	Livia Natália Sales	Aceito

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

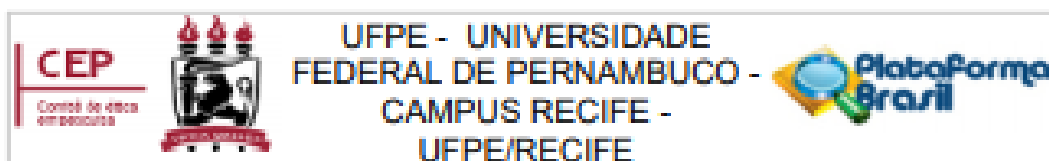
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81) 2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.784.499

Outros	lattespesquisador.pdf	20:56:03	Brito	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	28/02/2021 20:51:51	Livia Natália Sales Brito	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 16 de Junho de 2021

Assinado por:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NO PERIÓDICO *JOURNAL OF ENDODONTICS*

Introduction

The *Journal of Endodontics* is owned by the American Association of Endodontists. Submitted manuscripts must pertain to endodontics and may be original research (eg, clinical trials, basic science related to the biological aspects of endodontics, basic science related to endodontic techniques, case reports, or review articles related to the scientific or applied aspects of endodontics). Clinical studies using CONSORT methods (<http://www.consort-statement.org/consort-statement/>) or systematic reviews using meta-analyses are particularly encouraged. Authors of potential review articles are encouraged to first contact the Editor during their preliminary development via e-mail at JEndodontics@UTHSCSA.edu. Manuscripts submitted for publication must be submitted solely to *JOE*. They must not be submitted for consideration elsewhere or be published elsewhere.

Disclaimer

The statements, opinions, and advertisements in the *Journal of Endodontics* are solely those of the individual authors, contributors, editors, or advertisers, as indicated. Those statements, opinions, and advertisements do not affect any endorsement by the American Association of Endodontists or its agents, authors, contributors, editors, or advertisers, or the publisher. Unless otherwise specified, the American Association of Endodontists and the publisher disclaim any and all responsibility or liability for such material.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see: <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Humans and animals rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for

the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram can be found on <http://www.consort-statement.org>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

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

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

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

Submit your article

Please submit your article via: <http://ees.elsevier.com/joe/>

Preparation:

General Points on Composition:

Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (eg, spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery because their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision or that have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the Journal of Endodontics:

- a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section "c," below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
- b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph for example, the introduction of authors' names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, "In 1983, Langeland et al, reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals" can be edited to: "Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al, 1983)." In this example, the paragraph's subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

c. Sentences are stronger when written in the active voice, that is, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus, or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”

g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

h. Authors should be aware that the JOE uses iThenticate, plagiarism detection software, to ensure originality and integrity of material published in the journal. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by the new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc.

When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Abstract Headings

Introduction, Methods, Results, Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly

established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Original Research Article Guidelines

Title Page

The title describes the major emphasis of the paper. It must be as short as possible without loss of clarity. Avoid abbreviations in the title because this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (eg, use sodium hypochlorite rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). Include the manuscript title; the names and affiliations of all authors; and the name, affiliation, and full mailing address (including e-mail) of the corresponding author. This author will be responsible for proofreading page proofs and ordering reprints when applicable. Also highlight the contribution of each author in the cover letter.

Abstract

The Abstract concisely describes the purpose of the study in 250 or fewer words. It must be organized into sections: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The hypothesis is described in the Abstract Introduction. The Abstract describes the new contributions made by this study. The Abstract word limitation and its wide distribution (eg, PubMed) make it challenging to write clearly. This section is written last by many authors. Write the abstract in past tense because the study has been completed. Provide 3-5 keywords.

Introduction

The introduction briefly reviews the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. Clearly describe the purpose of the study, the tested hypothesis, and its scope. Many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals; therefore, do not perform extensive literature review or discuss the results of the study in this section.

Materials and Methods

The Materials and Methods section is intended to permit other investigators to repeat your experiments. There are 4 components to this section: (1) detailed description of the materials used and their components, (2) experimental design, (3)

procedures employed, and (4) statistical tests used to analyze the results. Most manuscripts should cite prior studies that used similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. A "methods figure" will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then you must carefully describe the method and include validation experiments. If the study used a commercial product, the manuscript must either state that you followed manufacturer's protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an *in vitro* model to simulate a clinical outcome, describe either experiments made to validate the model or previous literature that proved the clinical relevance of the model. The statistical analysis section must describe which tests were used to analyze which dependent measures; *P* values must be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, dropouts from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

Results

Only experimental results are appropriate in this section; do not include methods, discussion, or conclusions. Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts, and Tables must be cited in the text in numerical order and include a brief description of the major findings. Consider using Supplemental Figures, Tables, or Video clips that will be published online. Supplemental material often is used to provide additional information or control experiments that support the results section (eg, microarray data).

Figures

There are 2 general types of figures: type 1 includes photographs, radiographs, or micrographs; type 2 includes graphs. *Type 1*: Include only essential figures and use composite figures containing several panels of photographs, if possible. Each panel must be clearly identified with a letter (eg, A, B, C), and the parts must be defined in the figure legend. A figure that contains many panels counts as 1 figure. *Type 2*: Graphs (ie, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). One example is a graph depicting pain scores over time. Use graphs when the overall trend of the results is more important than the exact numeric values of the results. A graph is a convenient way to report that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo-treated group over the first 24 hours, but pain reported was the same for both groups over the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

Tables

Tables are appropriate when it is critical to present exact numeric values; however, not all results need be placed in either a table or figure. Instead of a simple

table, the results could state that there was no inhibition of growth from 0.001%-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03%-3% NaOCl (N=5/group). If the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure.

Acknowledgments

All authors must affirm that they have no financial affiliation (eg, employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultancies, patent licensing arrangements, or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past 3 years. Disclose any potential conflict of interest. Append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Disclose all sources and attribute all grants, contracts, or donations that funded the study. Specific wording: "The authors deny any conflicts of interest related to this study."

References

The reference style can be learned from reading past issues of *JOE*. References are numbered in order of citation. Place text citation of the reference Arabic number in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

Other Article Types and Guidelines

Manuscripts submitted to *JOE* that are not Original Articles must fall into one of the following categories. Abstract limit: 250 words. Note that word limits, listed by type, do not include figure legends or References. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories listed or if you would like to request pre-approval to submit additional figures, contact the Editor at JEndodontics@uthscsa.edu.

CONSORT Randomized Clinical Trial

Must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials—CONSORT—minimum guidelines for publication of randomized clinical trials (<http://www.consort-statement.org>). Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Review Article

Either narrative articles or systemic reviews/meta-analyses. Case Report/Clinical Techniques articles, even when they include an extensive review of the literature, are categorized as Case Report/Clinical Techniques. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Clinical Research

Prospective or retrospective studies of patients or patient records, research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Biology

Animal or culture studies of biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation, or pathology. Primary focus is on biology. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Technology

Focus primarily on research related to techniques and materials used, or on potential clinical use, in endodontics. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 3. Maximum number of tables: 3.

Case Report/Clinical Techniques

Reports of an unusual clinical case or use of a cutting edge technology in a clinical case. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Electronic artwork

General points:

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
- TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
- TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
- TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

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

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

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

References

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not allowed in the reference list, but they may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames,

journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web References

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references are included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-endodontics>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by Arabic numerals in parentheses, numbered in the order in which they appear in the text. *List*: Number the references in the list in the order in which they appear in the text. List 3 authors then et al.

Examples:

Journal article:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun*. 2010;163:51–59.
Book:
2. Strunk W Jr, White EB. *The Elements of Style*, 4th ed. New York: Longman; 2000.
Chapter in an edited book:
3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, eds. *Introduction to the Electronic Age*. New York: E-Publishing; 2009:281–304.

Journal abbreviations source

Journal names are abbreviated according to Index medicus.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at: <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See: <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions.

- All tables (including title, description, footnotes).

Further considerations:

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'.
- References are in the correct format for this journal.
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa.
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet).
- Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white.
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For any further information please visit our customer support site at: <http://support.elsevier.com>.