



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS
RADICULARES RESIDUAIS**

LÍVIA NATÁLIA SALES BRITO

CAMPINA GRANDE/ PB

2016

LIVIA NATÁLIA SALES BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS
RADICULARES RESIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB),
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre
em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Coorientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

CAMPINA GRANDE/ PB

2016

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

B862a Brito, Livia Natália Sales.

Avaliação imunoistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos radiculares residuais [manuscrito] / Livia Natália Sales Brito. - 2016.

99 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy, Departamento de Odontologia".

"Co-Orientação: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Departamento de Odontologia".

1. Imuno-histoquímica. 2. Galectinas. 3. Granuloma periapical. 4. Cisto radicular. 5. Cistos maxilomandibulares. I.

Título.

21. ed. CDD

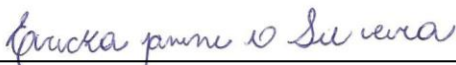
LIVIA NATÁLIA SALES BRITO

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM
GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS
RADICULARES RESIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

DATA DA DEFESA: 27/07/2016

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira / UFRN

Membro titular (1ºExaminador)



Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves / UEPB

Membro titular (2ºExaminador)



Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy / UEPB/UFPE

Membro titular (Orientador)

Dedicatória

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

*Aos meus pais **Brito e Fátima**, minhas joias raras, por todo o amor, apoio, compreensão, incentivo e abdições sofridas para que eu pudesse realizar meus sonhos.*

Vocês são meus amores e essa conquista é nossa!

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

*A minha sobrinha/afilhada **Maria Luiza**, um presente de Deus que ainda nem chegou nesse mundo, mas pela qual já tenho um amor imenso.*

Venha cheia de saúde, minha flor!

Agradecimientos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy**. Sua serenidade, coerência e entusiasmo me trouxeram conforto e segurança nessa jornada. O seu exemplo me dá estímulo a querer buscar novos desafios e ser cada dia melhor. Obrigada pela confiança, paciência, carinho ao ensinar, solicitude, conselhos e amizade! Que Deus o abençoe!

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**. Serei eternamente grata pelo apoio dado durante minha caminhada acadêmica. Obrigada pela constante motivação, dedicação, solicitude, gentileza e paciência ao me ensinar. Foi uma grande honra ser coorientada pelo senhor e rogo a Deus que sua vida seja repleta de realizações.

À **Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves** pelos ensinamentos, auxílios, carinho, confiança, motivação e atenção dadas a mim. A senhora é uma grande inspiração de profissionalismo, dedicação, competência e gentileza. Muito obrigada por tudo!

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, **Prof. Dr. Alessandro Leite Cavalcanti, Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Profa. Dra. Ana Flávia Granville-Garcia, Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Profa. Dra. Daniela Pita de Melo, Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira, Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez, Profa. Dra. Maria Helena Chaves de V. Catão, Profa. Dra. Patrícia Meira Bento e o Prof. Dr. Sérgio d'Ávila Lins B. Cavalcanti**, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas que contribuíram para o meu crescimento intelectual.

À minha turma de mestrado **Carolina, Fernada, Hellen, Hianne, Jammeson, Jéssica, José Matheus, Katharina, Matheus Perazzo, Monalyza e Naiana** pelos momentos compartilhados durante esses dois anos. Tenho certeza que todos cresceram muito nesse período e serão grandes profissionais em suas áreas.

Em especial, gostaria de agradecer ao meu “*Bata*”. Meus amores, ao lado de vocês esses dois anos passaram com mais serenidade e descontração. O mundo precisa de mais pessoas assim: inteligentes, competentes e amáveis. Estivemos juntos nas alegrias e nos momentos de angústia, e tenho certeza que assim permaneceremos, mesmo que os encontros se tornem menos frequentes.

Aos meus “irmãos patinhos” **Hellen Bandeira de Pontes Santos e José Matheus Alves dos Santos** pela amizade sincera, momentos de descontração e inúmeros auxílios prestados durante minha caminhada acadêmica. Não tenho dúvidas que o futuro de vocês será brilhante. Vocês moram no meu coração.

Ao meu querido **Arley de Sousa Leitão** pelo carinho e paciência ao me ensinar a imunistoquímica, por me ouvir, me aconselhar e simplesmente por existir. Você é um irmão que a vida me deu. Agradeço a Deus a nossa amizade.

Eu te amo e você sabe disso!

Aos demais discentes do mestrado e do doutorado que fizeram parte dessa caminhada e que de forma direta ou indireta me auxiliaram. Em especial, às doutorandas **Geiza, Marayza e Fabianna**. Muito obrigada!

À minha comadre e amiga de longa data **Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**.

Sua amizade é um presente que a odontologia me deu. Os nossos primeiros passos acadêmicos foram dados juntos e espero que continuemos sempre unidas. Obrigada pela torcida e apoio de sempre!

À **Profa. Dra. Kátia Simone Alves dos Santos** que foi minha primeira grande incentivadora e inspiração na endodontia. Mesmo de longe, acompanhou minha caminhada e vibrou com minhas conquistas. Meu carinho e admiração por você são eternos.

Ao **Prof. Dr. Yuri Cavalcanti Wanderley** por todas as contribuições dadas durante o mestrado.

Às queridas funcionárias **Ana Luzia, Denize e Pâmela**, sempre solícitas e amáveis ao me ajudar quando precisei. Jamais me esquecerei de vocês.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)** pela parceria e imensas contribuições dadas para a realização desse trabalho.

À **Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)**. Tenho muito orgulho ter feito minha graduação e pós-graduação nessa Instituição e sou imensamente grata por toda a contribuição que me foi fornecida.

A **CAPES** pelo apoio financeiro concedido.

Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e seus planos serão bem-sucedidos.

(Provérbios 16:3)

Resumo

RESUMO

Estudos revelam que as galectinas exercem importante papel na resposta imunoinflamatória, através da regulação da homeostase e em funções de células imunes. Todavia, a participação destas proteínas no desenvolvimento de lesões periapicais ainda não foi esclarecida. O objetivo do estudo foi avaliar, por meio de imunoistoquímica, a expressão das galectinas -1, -3 e -7 em granulomas periapicais (GPs), cistos radiculares (CRs) e cistos radiculares residuais (CRRs), correlacionando-as com parâmetros morfológicos (intensidade do infiltrado inflamatório e padrão de revestimento epitelial). Amostra composta por 20 GPs, 20 CRs e 20 CRRs foi submetida à imunoistoquímica. As células inflamatórias e epiteliais foram quantificadas à partir da imunoexpressão nuclear e/ou citoplasmática/membranar e dados seus percentuais foram submetidos à avaliação estatística. Os resultados para a avaliação morfológica revelaram que 100% dos GPs e 80% dos CRs apresentaram um intenso infiltrado inflamatório (grau III), e para os CRRs, 60% apresentaram um infiltrado inflamatório leve (grau I). Na análise do revestimento epitelial das lesões císticas, o padrão atrófico foi observado em 65% dos CRRs e 50% dos CRs, já o hiperplásico, em 50% dos CRs e 35% dos CRRs. A avaliação imunoistoquímica de cada galectina no componente conjuntivo, demonstrou que os GPs apresentaram uma maior expressão da galectina -1 em relação aos CRs e CRRs tanto no núcleo quanto no componente citoplasmático/membranar das células inflamatórias ($p < 0,05$). Adicionalmente, as lesões que apresentaram inflamação grau III tiveram uma maior expressão da galectina-1 em ambos componentes celulares ($p < 0,05$). A galectina-3 não demonstrou diferenças estatisticamente significativas nas células inflamatórias do componente conjuntivo ($p > 0,05$). Para a galectina-7, os GPs apresentaram uma maior imunoexpressão desta proteína no componente citoplasmático/membranar, comparadas aos CRs e CRRs ($p < 0,05$) e independente do tipo de lesão, as que apresentaram infiltrado inflamatório grau III tiveram maior imunoexpressão da galectina-7 ($p < 0,05$). No componente epitelial, as galectinas -1 e -3 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de imunoexpressão ($p > 0,05$). Todavia, a imunoexpressão da galectina-7 revelou que o revestimento epitelial de CRRs apresentaram um maior percentual de positividade nuclear quando comparado ao revestimento dos CRs ($p = 0,014$). Lesões com epitélio hiperplásico exibiram maior positividade citoplasmática/ membranar quando comparadas às de epitélio atrófico ($p = 0,020$). Foram observadas correlações positivas para cada uma das galectinas no componente epitelial e conjuntivo de todas as lesões.

Adicionalmente, foram observadas correlações positivas entre as galectinas -1 e -7 no tecido conjuntivo ($p < 0,001$), independente do tipo de lesão. Em conclusão, os resultados do presente estudo evidenciam a participação destas proteínas na modulação da resposta imunoinflamatória entre lesões periapicais.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, galectinas, granuloma periapical, cisto radicular, cistos maxilomandibulares.

Abstract

ABSTRACT

Studies demonstrate that galectins are involved in the development of immunoinflammatory response, by regulation of homeostasis and immune cell functions. However, the function of these lectins in the development of periapical lesions are scarce in the literature. The objective of this study was to evaluate, through immunohistochemistry, the expression of galectinas -1, -3 and -7 in periapical granulomas (PGs), radicular cysts (RCs), and residual radicular cysts (RRCs), related this with morphological parameters (intensity of the inflammatory infiltrate and the thickness of the cystic epithelial lining). The sample consisted of 20 periapical granulomas (PGs), 20 radicular cysts (RCs), and 20 residual radicular cysts (RRCs) were submitted to immunohistochemistry. The inflammatory and epithelial cells were quantified from nuclear and/or cytoplasmic/membrane expression and their percentage submitted for statistical evaluation. The results for the morphological analysis revealed that 100% of GPs and 80% of CRs showed an intense inflammatory infiltrate (grade III), and to CRRs, 60% had a mild inflammatory infiltrate (grade I). The analysis of epithelial lining in cystic lesions showed that atrophic epithelium was observed in 65% of CRRs and 50% of the RCs, the hyperplastic epithelium was demonstrated, respectively, in 50% and 35% of the RCs of CRRs. Immunohistochemical evaluation of each galectin in connective tissue demonstrated that GPs exhibited higher expression of galectin -1 in relation to RCs and CRRs in both components (nucleus and cytoplasmic/membrane) of inflammatory cells ($p < 0.05$). Additionally, lesions that exhibit inflammation grade II had an increased expression of galectin-1 in both cell components ($p < 0.05$). Galectin-3 showed no differences statistically significant in inflammatory cells of connective tissue ($p > 0,05$). In Galectin-7, GPs showed a higher immunoreactivity of this protein in cytoplasmic/membrane component, compared to CRs and CRRs ($p < 0.05$) and independently of the type of lesion, those with inflammatory infiltrate grade III had greater immunoreactivity of galectin-7 ($p < 0.05$). In the epithelial lining, galectins -1 and -3 showed no statistically significant differences of immunoreactivity ($p > 0.05$). However, the immunohistochemical expression of galectin-7 revealed that epithelial lining of CRRs showed a higher percentage of nuclear expression than CRs epithelial lining ($p = 0.014$). Lesions with hyperplastic epithelium showed a greater cytoplasmic/membrane positivity than lesions with atrophic epithelium ($p = 0.020$). Positive correlations were observed to each galectin on epithelial and connective tissues. In addition, positive correlations were observed between galectins -1 and -7 into connective tissue ($p <$

0.001), independent the type of lesion. In conclusion, the results of this study show the involvement of these proteins in the modulation of immunoinflammatory response among periapical lesions.

Keywords: immunohistochemistry, galectins, periapical granuloma, radicular cysts, jaw cysts.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Membros da família das galectinas, que são reconhecidas pelos seus DRCs. Na imagem representativa das galectinas tipo protótipo, observa-se suas estruturas monovalentes e bivalentes. Para a galectina químera, destaca-se a formação de pentâmeros, quando ligadas a carboidratos polivalentes. Já as galectinas tipo tandem repetida apresentam dois DRCs distintos, porém ligados, formando dímeros. Destaca-se ao lado direito das imagens, formações reticulares por meio de ligações galectina-glicano..... **33**
- Figura 1. Fotomicrografias representativas da expressão imunoistoquímica da galectina-1. (A) Células inflamatórias do tecido conjuntivo de GP evidenciando expressão citoplasmática/membranar (seta) e nuclear (cabeça de seta) (x400). (B) Expressão citoplasmática/membranar (seta) na camada basal do revestimento epitelial hiperplásico de CR (x400). (C) Ausência de expressão da galectina-1 no revestimento epitelial atrófico de CRR e escassa expressão no infiltrado inflamatório (x400)..... **69**
- Figura 2. Fotomicrografias representativas da expressão imunoistoquímica da galectina-3. (A) Fraca expressão no infiltrado inflamatório de GP (x400). (B) Ausência de expressão no revestimento epitelial hiperplásico de CR e baixa expressão no infiltrado inflamatório (x400). (C) Ausência de expressão no revestimento epitelial hiperplásico de CRR e baixa expressão no infiltrado inflamatório (x400)..... **70**
- Figura 3. Fotomicrografias representativas da expressão imunoistoquímica da galectina-7. (A) Presença de alta expressão citoplasmática/membranar em células inflamatórias de GP (x400). (B) Alta expressão citoplasmática/membranar no revestimento epitelial hiperplásico de CR, com destaque para a ausência de expressão nuclear (cabeça de seta) (x400). (C) Expressão citoplasmática/membranar (seta) e nuclear (cabeça de seta) no

revestimento epitelial atrófico de CRR
(x400).....

Lista de quadros

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Variáveis dependentes do estudo.....	42
Quadro 2. Variáveis independentes analisadas no estudo.....	42
Quadro 3. Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectina 1, anti-galectina 3 e anti-galectina 7.....	44

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectina 1, anti-galectina 3 e anti-galectina 7.....	65
Tabela 2	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 e significância estatística para as imunexpressões das galectinas-1, -3 e -7 no tecido conjuntivo de acordo com o tipo de lesão, intensidade do infiltrado inflamatório e espessura do revestimento epitelial.....	66
Tabela 3	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 e significância estatística para as imunexpressões das galectinas-1, -3 e -7 no tecido epitelial de acordo com o tipo de lesão, intensidade do infiltrado inflamatório e espessura do revestimento epitelial.....	67
Tabela 4	Análise de correlação de Spearman entre as imunexpressões das galectinas-1, -3 e -7, de acordo com o tipo de tecido	68

Lista de abreviações e siglas

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BSA	Do inglês <i>bovine serum albumin</i> , traduzido como albumina de soro bovino
CD3	Do inglês <i>cluster of differentiation 3</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 3.
CR	Cisto Radicular
CRR	Cisto Radicular Residual
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidratos
Fox P3	Do inglês <i>Forkhead box p3</i> , refere-se ao fator de transcrição FoxP3
GP	Granuloma Periapical
H.E	Hematoxilina e eosina
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-17	Do inglês <i>interleukin-17</i> , traduzido como interleucina-17.
IL-23	Do inglês <i>interleukin-23</i> , traduzido como interleucina-23.
IL-6	Do inglês <i>interleukin-6</i> , traduzido como interleucina-6.
ImageJ	<i>Imaging Processing and Analysis in Java</i>
JNK	Proteína quinase c-Jun N-terminal
kDa	Kilodalton
NK	Do inglês <i>Natural killer</i> , traduzido como matadora natural.
PH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Polimorfonucleares
SPSS	Do inglês <i>statistical package for the social sciences</i> , traduzido como pacote de serviço estatístico para as ciências sociais.
TGF- β	Do inglês <i>transforming growth factor-β</i> , traduzido como fator transformante de crescimento- β .
Th2	Do inglês <i>T helper 2</i> , traduzido como célula T auxiliar
Treg	Do inglês <i>regulatory T cell</i> , traduzido como célula T regulatória.
TRIS-HCL	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
VEGF	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.

Sumário

SUMÁRIO

	Página
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 26
2	OBJETIVOS..... 36
2.1	OBJETIVO GERAL..... 36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 36
3	METODOLOGIA..... 38
3.1	ASPECTOS ÉTICOS..... 38
3.2	TIPO DE ESTUDO..... 38
3.3	POPULAÇÃO..... 38
3.4	AMOSTRA..... 38
3.4.1	Critérios de inclusão..... 39
3.4.2	Critérios de exclusão..... 39
3.5	VARIÁVEIS..... 39
3.6	ESTUDO MORFOLÓGICO..... 41
3.7	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO..... 41
3.7.1	Método imunoistoquímico..... 41
3.7.2	Análise imunoistoquímica..... 44
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 44
4	ARTIGO..... 47
4.1	APRESENTAÇÃO..... 47
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO..... 48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 71
	REFERÊNCIAS..... 73
	APÊNDICES..... 79
	ANEXOS..... 82

Considerações iniciais

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A infecção do canal radicular após a necrose pulpar segue um percurso natural no sentido apical, capaz de induzir uma inflamação das estruturas periapicais. Este processo de agressão pode estimular a destruição dos tecidos periapicais e induzir a perda de estrutura dental, caracterizando uma reabsorção radicular inflamatória apical (ESTRELA et al., 2014). Segundo García et al. (2007), quando uma infecção se espalha para o periápice, uma resposta inflamatória do tecido conjuntivo periapical é produzida sob a forma de um abscesso ou lesão aguda. Com a permanência do estímulo, após a fase aguda, a lesão pode evoluir dando origem a uma das suas formas crônicas: granuloma periapical (GP) ou cisto radicular (CR). Portanto, os GPs e CRs são lesões crônicas moduladas por um conjunto de mediadores inflamatórios, liberados em resposta aos componentes microbianos, na tentativa de conter a infecção periapical (NAIR., 2004; MARÇAL et al., 2010).

Os GPs representam a alteração de natureza inflamatória mais comumente encontrada nos ossos gnáticos, e correspondem, respectivamente, à 59,7% e 40,4% das lesões periapicais radiolúcidas de origem inflamatória diagnosticadas após biópsia (BECCONSALL-RYAN et al. 2010; KOIVISTO; BOWLES; ROHRER, 2012). A inflamação persistente nos tecidos periapicais está associada com a reabsorção de osso adjacente, o qual é substituído por tecido conjuntivo fibrovascular. Geralmente os GPs apresentam-se assintomáticos, cujos aspectos radiográficos são representados por uma área radiolúcida de tamanho variável, redonda à oval, de margens bem definidas, com perda da lâmina dura na porção apical do dente envolvido (NEVILLE et al., 2009; PEIXOTO et al., 2012). Embora GPs não exibam a organização morfológica típica de uma reação de granulação, seu mecanismo de formação é relativamente semelhante. Nesse contexto, as citocinas têm sido consideradas como elementos-chave na formação de GPs (SILVA et al, 2007; NEVILLE et al., 2009).

O GP é uma lesão inflamatória crônica, constituída por tecido de granulação e composta por um número variável de células inflamatórias crônicas, como linfócitos, plasmócitos, mastócitos e macrófagos, observada no ápice de um dente cuja polpa apresenta-se não vital (NAIR, 2004; OMOREGIE et al., 2011; MARTÍN-GONZALES et al., 2015). Para García et al. (2007), é comum também encontrar ninhos/ ilhas de epitélio que possuem uma latente capacidade de proliferar, denominados restos epiteliais de Malassez. Como consequência da reação inflamatória e da resposta imunológica, estes restos epiteliais de Malassez podem ser estimulados a proliferar e resultar no desenvolvimento de um CR

(MUGLALI et al., 2008; LIN et al., 2009).

Há muito se discute sobre a patogênese dos CRs, destacando-se a teoria de Ten Cate (1972), cuja explicação para formação cística seria a falta de suporte nutricional. Segundo este autor, quando a proliferação celular interna do GP não recebe, por difusão, 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. Alguns anos depois, Torabinejad (1983) relatou que a resposta humoral e celular, os eventos bioquímicos e celulares da inflamação e os moduladores da matriz extracelular pareciam estar envolvidos na formação e desenvolvimento das lesões periapicais crônicas. Esta evidência baseou-se na presença de leucócitos polimorfomucleares (PMN), linfócitos e plasmócitos no epitélio das lesões periapicais, presença de imunoglobulinas (Ig) no fluido do cisto, tais como IgA, IgM e IgG, e a descontinuidade nos revestimentos epiteliais na maioria destes cistos. Nesse contexto, o autor concluiu que um elemento-chave no desenvolvimento e regressão dos CRs é a resposta imune.

Para García et al. (2007), Shear e Speight (2007) e Muglali et al. (2008), o desenvolvimento dos CRs 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.

Com relação à epidemiologia da lesão, Grossmann et al. (2007) e Johnson et al. (2013) ressaltaram que os CRs representam o tipo mais comum de lesão odontogênica de origem inflamatória encontrada nos ossos gnáticos, correspondendo, respectivamente, a 45,7% e 61% destas patologias. A maioria dos CRs são assintomáticos e descobertos em radiografias periapicais de rotina, em dentes cujas polpas apresentam ausência de vitalidade. Em lesões maiores, podem ser observadas tumefação, leve sensibilidade e mobilidade dos dentes adjacentes. Radiograficamente é observada uma perda de continuidade da lâmina dura, demonstrando uma imagem radiolúcida de formato oval a arredondado, de tamanho variável, no ápice da raiz do dente correspondente (SHEAR; SPEIGHT, 2007; NEVILLE et al., 2009).

Histopatologicamente, o CR exibe a uma cavidade cística revestida parcial ou totalmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado. Esse limitante epitelial é suportado por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso que possui um infiltrado de células inflamatórias crônicas de quantidade variada (TSAI et al., 2004; BECCONSALL-RYAN et

al., 2010; KADAM et al. 2014). Cury et al. (1998) propuseram uma subdivisão dos CRs considerando o padrão de revestimento epitelial. Foram classificados em atróficos, 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. Já os hiperplásicos eram os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável e com interfaces epitélio/cápsula arciformes. Embora CRs possam apresentar-se clinicamente como lesões expansivas, estes podem mostrar momentos de quiescência. Apesar de não ser possível a identificação precisa de momentos de latência ou de crescimento, os CRs podem ser classificados de acordo com o estado do epitélio cístico, considerando-o como um parâmetro histopatológico confiável de atividade biológica (cistos ativos) e/ou inatividade do crescimento (cistos inativos).

Os CRs que permanecem nos ossos gnáticos após remoção do dente associado são denominados de cistos radiculares residuais (CRRs). Estas lesões são semelhantes aos CRs, contudo, elas não têm qualquer comunicação com o sistema de canais radiculares infectado anteriormente (LIN et al., 2009). Segundo Selvamani et al. (2012), CRRs são encontrados, predominantemente, na região anterior da maxila e apresentam uma prevalência de 3,3% dentre as lesões císticas de origem odontogênica.

O CRR é geralmente uma lesão assintomática, descoberta em exames radiográficos de rotina de uma área edêntula. Em alguns casos, eles podem causar expansão das corticais ósseas, invadir para a região de seio maxilar ou comprimir o canal alveolar inferior. Radiograficamente, pode-se observar uma área radiolúcida de forma arredondada e margens bem definidas. Todavia, a degeneração dos constituintes celulares no lúmen leva ocasionalmente à calcificação distrófica e à radiopacidade central do lúmen (NEVILLE et al., 2009).

Os CRRs apresentam características histopatológicas semelhantes às observadas em CRs. Devido o histórico do agente causador ter sido removido previamente, tais lesões podem se tornar progressivamente menos inflamadas, de modo que sua cápsula pode ser composta por tecido conjuntivo fibroso de maior densidade. Assim, o revestimento epitelial pode apresentar-se delgado e regular, mimetizando o encontrado em cistos de desenvolvimento (SHEAR; SPEIGHT, 2007).

As lesões periapicais ocorrem como resultado da ativação de reações de defesa locais contra patógenos intracanaís. Essas respostas imunológicas podem estar funcionando ativamente durante a patogênese das lesões, uma vez que os elementos bacterianos agem como antígenos, estimulando várias formas de respostas imunes, sendo estas, caracterizadas

em CRs e GPs pela migração persistente de leucócitos PMNs, monócitos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos nos locais infectados (KANEKO et al., 2001; MARÇAL et al., 2010). Já as citocinas, são proteínas secretadas por leucócitos e por várias outras células, como resposta aos antígenos, que por sua vez, regulam a resposta imune (MUGLALI et al., 2008).

Uma rede de fatores inibitórios e estimulatórios pode influenciar a intensidade de defesa e respostas inflamatórias, assim como o balanço entre a reabsorção e a regeneração óssea, resultando numa expansão ou reparo das lesões periapicais (MARTÓN; KISS, 2014; DILL et al., 2015). Nesse contexto, várias citocinas têm sido implicadas individualmente na patogênese de lesões periapicais. Estes mediadores desempenham um importante papel nas respostas imunes e inflamatórias dentro do microambiente ósseo periapical, uma vez que o desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode resultar na reabsorção óssea em lesões periapicais (SILVA et al., 2007; ARANHA et al., 2013; CAMPOS et al., 2015).

A identificação dos mediadores químicos associados aos fenômenos inflamatórios para o desenvolvimento das lesões periapicais é de suma importância. Embora seja reconhecida a participação da resposta imune na formação de lesões periapicais, sua patogênese ainda não está bem definida (IHAN HREN; IHAN, 2009; TEIXEIRA-SALUM et al., 2010)

A expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem sido implicada como um importante fator de desenvolvimento de tecido de granulação (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005). Através de imunoistoquímica, Nonaka et al. (2008) observaram uma associação entre a expressão desta proteína e a intensidade do infiltrado inflamatório de lesões periapicais de origem inflamatória, principalmente em GPs e CRs. Para os autores, a baixa expressão desta proteína está relacionada a uma resposta inflamatória de menor intensidade, atribuída ao decréscimo de citocinas no interior destas lesões.

De acordo com Peixoto et al. (2012), atualmente, o fator de transcrição Forkhead Box P3 (FoxP3) é o melhor e mais confiável marcador imunoistoquímico para as células T regulatórias (Treg), e a função básica desta proteína é a de regular a atividade destas células. Sendo assim, ao comparar a quantidade de células Treg em CRs e GPs, os autores observaram que este tipo celular estava presente em ambas lesões periapicais. Entretanto, houve uma maior imunoexpressão de células Treg em GPs do que em CRs. Esse fato sugere a participação desta proteína na modulação da resposta inflamatória inicial, uma vez que não houve correlação da expressão do FoxP3 em relação à intensidade do infiltrado e o padrão de revestimento cístico dos CRs.

Segundo Andrade et al. (2013), dentro dos mecanismos de resposta imune, pouco se sabe sobre como o conjunto de citocinas envolvidas no desenvolvimento e manutenção dos processos inflamatórios crônicos é regulado, e como o perfil destas citocinas correlaciona-se com a composição do infiltrado inflamatório. Todavia, sabe-se que as células Th17 e células Treg desempenham um papel crítico na homeostase imune celular. Além disso, sabe-se que baixos níveis do fator transformante de crescimento β 1 (TGF- β 1), interleucina 23 (IL-23) e interleucina 6 (IL-6) no microambiente tecidual podem induzir o desenvolvimento de células Th17. Sendo assim, os autores compararam a imunexpressão da IL-17, TGF- β 1 e FoxP3 em GPs, CRs e CRRs, e observaram que os mecanismos envolvidos na imunopatogênese das lesões periapicais é bastante complexo, e uma ampla variedade de respostas imunológicas nos tecidos perirradiculares é estimulada, onde células Th17 e células Treg podem participar dos mecanismos imunes simultaneamente, exercendo efeitos moduladores opostos.

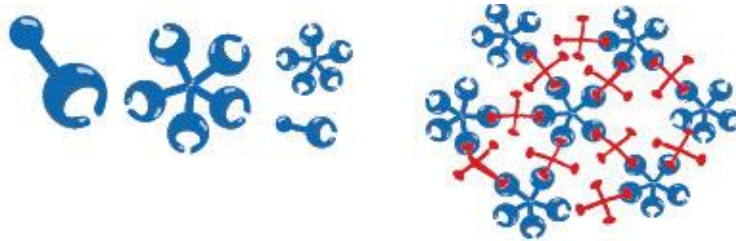
No contexto das lesões imunoinflamatórias, algumas citocinas têm sido bastante estudadas. Sabe-se que as galectinas, proteínas derivadas das lectinas, podem desempenhar diferentes papéis em várias respostas biológicas, tais como a regulação do crescimento celular, da resposta inflamatória e na manutenção da homeostase imune (LIU et al., 2002; CURCIARELLO et al., 2014; GENDRONNEAU et al., 2015). Estas proteínas podem ser expressas por uma variedade de tecidos e tipos celulares e estão implicadas em diversos processos celulares, incluindo as interações entre células, polaridade, tráfego de moléculas no meio intracelular e transdução de sinais (HIRABAYASHI et al., 2002; GENDRONNEAU et al., 2015).

As galectinas constituem uma família de lectinas animais, que exhibe uma sequência permanente de domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) constituída por aproximadamente 130 aminoácidos, com afinidade por β -galactosídeos (SUZUKI et al., 2008). Após sua descoberta, 15 tipos de galectinas foram isoladas e classificadas em três subgrupos, de acordo com a organização dos DRCs: As galectinas prototípicas, que possuem um único DRC (galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15), as galectina tipo *tandem* repetido que contém 2 DRCs homólogos em uma única cadeia polipeptídica (galectinas -4, -6, -8, -9 e -12). E por sua vez, a galectina tipo químera (galectina -3) que possui uma região N-terminal não-lectina conectada a 1 DRC (LIU et al., 2002; FUKUMORI; KANAYAMA e RAZ, 2007; LIU; RABINOVICH, 2010; PANJWANI, 2014) (Figura 1).

a) Galectinas tipo protótipo (1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15)



b) Galectina tipo quimera (galectina 3)



c) Galectinas tipo *tandem* repetida (4, 6, 8, 9, 12)

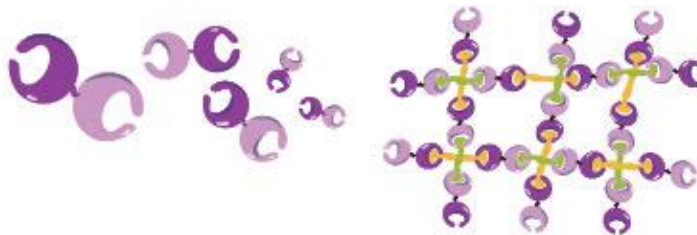


Figura 1: Membros da família das galectinas, que são reconhecidas pelos seus DRCs. Na imagem representativa das galectinas tipo protótipo, observa-se suas estruturas monovalentes e bivalentes. Para a galectina quimera, destaca-se a formação de pentâmeros, quando ligadas a carboidratos polivalentes. Já as galectinas tipo tandem repetida apresentam dois DRCs distintos, porém ligados, formando dímeros. Destaca-se ao lado direito das imagens, formações reticulares por meio de ligações galectina-glicano. Fonte: Yang, Rabinovich e Liu (2008).

É congruente na literatura que as galectinas desempenham papéis fundamentais na homeostase celular durante respostas imunes inata e adaptativa, por modulação da apoptose

de células T, proliferação e adesão celular, quimiotaxia e síntese de mediadores inflamatórios, tais como as citocinas, o óxido nítrico e as prostaglandinas. Todavia, ainda há dúvidas de como diferentes galectinas com semelhantes especificidades de carboidratos podem desencadear efeitos opostos para os mesmos tipos celulares (RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002; LIU et al., 2002; LIU; RABINOVICH, 2010; PANJWANI, 2014).

A galectina-1 é uma proteína homodimérica não covalente de 14kDa, com sítio ligante à galactosina que preferencialmente reconhece carboidratos de superfície celular. É amplamente expressa em muitos tecidos de vertebrados e invertebrados, onde após secreção, exige uma rápida associação com ligantes extracelulares a fim de manter a atividade e a estabilidade (LEE et al., 1990; CHO; CUMMINGS, 1995; CHIANG et al., 2008). Segundo Elola et al. (2005), a galectina-1 está presente tanto no meio extracelular quanto no intracelular. A presença de galectina-1 em órgãos linfoides primários e secundários, tais como o timo, os gânglios linfáticos e o baço, tem ligação com a capacidade desta lectina em induzir a apoptose em células T maduras e imaturas, o que sugere a notável participação desta galectina na regulação da resposta imune (RABINOVICH; RIERA; SOTOMAYOR, 1999).

Curciarello et al. (2014) relataram que os atuais estudos *in vivo* apontam um papel anti-inflamatório da galectina-1. Todavia, as funções destas dependem da sua ligação a ligantes específicos, como por exemplo, a laminina, a fibronectina e a vitronectina, assim como a integrinas através de ligações dependentes de carboidratos (ELOLA et al., 2005). Devido o conhecimento atual sobre os mecanismos destas lectinas, grande atenção vem sendo dada à manipulação das galectinas-1, sendo promissor seu uso terapêutico em doenças autoimunes de origem inflamatória mediadas por células T, bem como na terapia contra o câncer (CEDENO-LAURENT; DIMITROFF, 2012).

A galectina-3, um produto gênico quimérico de 31kDa, é uma lectina intracelular e extracelular, que interage com glicoproteínas da matriz extracelular (BARONDES et al., 1994). Segundo Fukumori, Kanayama e Raz (2007) e Suzuki et al. (2008), é uma proteína multifuncional que regula o crescimento, a adesão, a proliferação celular, a angiogênese e a apoptose.

Esta proteína tem uma ampla distribuição nos tecidos e existe em abundância no epitélio de vários órgãos, tais como os pulmões, os intestinos e a pele, sendo amplamente expressa em células cancerígenas, bem como em células epiteliais e do sistema imune (TAKENAKA et al., 2004; CHEN et al., 2006; CHIANG et al., 2008; ARAD et al., 2015). A galectina-3 é considerada um regulador positivo da proliferação de células T, que pode protegê-las da apoptose, bem como um ativador da fagocitose de macrófagos e neutrófilos e

da produção de espécies reativas de oxigênio (LIU et al., 2002). É expressa em um vasto número de células inflamatórias, incluindo monócitos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, células *natural killer* (NK), além de linfócitos B e T ativados (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Segundo Nangia-Makker et al. (2000), a galectina-3 também desempenha um importante papel nos mecanismos de angiogênese.

A galectina-3 tem a capacidade de agir de uma forma dual, podendo exibir marcação imunoistoquímica nuclear, citoplasmática ou em ambas. Sua marcação citoplasmática está associada a sua função antiapoptótica, favorecendo a progressão tumoral. Todavia, quando expressa no núcleo, a sua função antiapoptótica é perdida. Além de modular a homeostase das células T, a galectina-3 regula a sobrevivência das células imunes, a migração e liberação de citocinas (TAKENAKA et al., 2004; DHIRAPONG et al., 2009).

De acordo com Dhirapong et al. (2009) e Curciarello et al. (2014), as galectinas-1 e -3 aparentam ter papéis opostos, podendo atuar em conjunto na regulação da resposta inflamatória e na manutenção da homeostase imune, podendo desempenhar papéis importantes na modulação da resposta imune frente a bactérias.

Já a galectina-7 é uma proteína monomérica que foi descrita, inicialmente, por Madsen et al. (1995) como um marcador de diferenciação dos ceratinócitos. Segundo Kuwabara et al. (2002) e Ueda et al. (2004), a galectina-7 é uma lectina animal, de 15 kDa, com afinidade por β -galactosídeos que é expressa em epitélio estratificado, sendo encontrada em diversas regiões, como: pele, língua e esôfago. A expressão desta lectina pode ser evidenciada no meio intracelular, seja no citoplasma ou no núcleo, como também no meio extracelular. De acordo com a sua localização celular, sugere-se o desenvolvimento de funções diferentes para a galectina-7, desde a manutenção do fenótipo normal das células epiteliais, até a regulação da apoptose (KUWABARA et al., 2002; PANJWANI, 2014).

Ao avaliar o papel da galectina-7 em transplantes cardíacos em ratos, Luo et al. (2013) observaram que a expressão desta lectina aumentou gradualmente com a severidade da rejeição do enxerto. Estes autores sugeriram que a galectina-7 pode estar associada com a resposta imune à rejeição, influenciando a homeostase das células T.

No contexto das lesões periapicais, Oliveira et al. (2014) avaliaram o papel das galectinas-3 e -9 e dos receptores *Toll-like-2* e -4 na resposta imunoinflamatória de GPs e CRs. Estes autores constataram que a biopatologia da doença periapical ocorre através de uma interação complexa entre as muitas moléculas bioativas envolvidas nas respostas imunológicas, e que a expressão das galectinas pode ser um importante fator envolvido na modulação das reações imunes. Todavia, até o presente momento, este foi o único estudo que

buscou associar estas lectinas à resposta imune em lesões periapicais. Sendo assim, observa-se a necessidade de mais estudos com o intuito de elucidar o papel das galectinas nesses mecanismos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo objetivou avaliar a expressão imunoistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em GP, CR e CRR, para verificar a participação dessas proteínas na patogênese dessas lesões periapicais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar morfológicamente os casos de GPs, CRs e CRRs quanto a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como o padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas.
- Quantificar a expressão das galectinas -1, -3 e -7 em GP, CR e CRR, especificando o compartimento celular de sua expressão (núcleo e citoplasma/membrana plasmática).
- Determinar diferenças percentuais na expressão de cada galectina em relação ao compartimento celular de expressão (núcleo e citoplasma/membrana plasmática).
- Correlacionar possíveis diferenças na imunoexpressão de cada marcador imunoistoquímico com a intensidade do infiltrado inflamatório (grau I, II e III).
- Correlacionar a quantidade de expressão de cada marcador imunoistoquímico com o padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas (hiperplásico/atrófico).
- Avaliar possíveis correlações entre as imunoexpressões das galectinas-1, -3 e -7 em GPs, CRs e CRRs.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 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 Estadual da Paraíba (UEPB) e teve seu registro com o número: 51330315.0.0000.5187 (ANEXO A).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

A presente pesquisa foi caracterizada como um estudo analítico descritivo e correlacional, com corte transversal, da expressão imunoistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em GPs, CRs e CRRs.

3.3 POPULAÇÃO

A população deste experimento foi formada pelo conjunto de casos de GPs, CRs e CRRs diagnosticados no período de outubro de 2010 a março de 2016, pertencentes aos arquivos do Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB.

3.4 AMOSTRA

O estudo foi realizado com uma amostra não probabilística de conveniência, constituída por 60 espécimes que foram fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina, obtidos a partir dos registros no Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB. Destes, 20 casos foram diagnosticados como GPs, 20 como CRs e 20 casos como CRRs.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo espécimes diagnosticados histopatologicamente como GPs, CRs e CRRs. Para os GPs, foram selecionados apenas os casos que se apresentavam ausentes de qualquer remanescente de epitélio odontogênico disperso no tecido conjuntivo constituinte da lesão. Para as lesões císticas, foram incluídos somente os espécimes que exibiam uma cavidade patológica revestida, total ou parcialmente, por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado e apresentavam uma quantidade suficiente de cápsula fibrosa para a realização das avaliações morfológicas e imunoistoquímicas.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os espécimes com quantidade insuficiente de material biológico nos blocos parafinados, bem como os casos de GPs e CRs relacionados a dentes com tratamento endodôntico prévio, tendo em vista a possibilidade de mudança de microbiota associada ao tratamento intra-radicular, e por conseguinte, o perfil de apresentação do infiltrado inflamatório nessas lesões.

3.5 VARIÁVEIS

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

Quadro 1. Variáveis dependentes analisadas no estudo.

Variável	Definição	Categoria
Imunoexpressão da galectina-1	Percentual de células positivas.	- Citoplasmáticas/ membrana plasmática. - Nuclear.
Imunoexpressão da galectina-3	Percentual de células positivas.	- Citoplasmáticas/ membrana plasmática. - Nuclear.
Imunoexpressão da galectina-7	Percentual de células positivas.	- Citoplasmáticas/ membrana plasmática. - Nuclear.

Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

Variável	Definição	Categoria
Tipo de lesão	Lesões periapicais crônicas de origem inflamatória	- Granuloma Periapical - Cisto Radicular - Cisto Radicular Residual
Intensidade do infiltrado inflamatório	Intensidade de células inflamatórias presentes no campo microscópico.	- Grau I - Grau II - Grau III
Padrão de revestimento epitelial	Padrão predominante de revestimento epitelial encontrado nas lesões císticas.	- Atrófico - Hiperplásico

3.6 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 (H.E). A intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como o padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas foram os aspectos histopatológicos analisados. 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. (2012). A partir da porção central dos GPs e da luminal das lesões císticas em direção à periferia, foi considerado 1 campo microscópico, sob o aumento de 200x. Os espécimes cujo infiltrado inflamatório se apresentou restrito 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).

Para os CRs e CRRs, o padrão do revestimento epitelial foi analisado de acordo com metodologia proposta por Moreira et al. (2000). Com base no padrão predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os cistos 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 formando projeções ondulares e interface arciforme entre a cápsula e o revestimento epitelial.

3.7 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.7.1 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 organossilano (3-aminopropiltriétoxisilano, Sigma Chemical

Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Reveal*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), utilizando anticorpos monoclonais anti-galectina-1, anti-galectina-3 e anti-galectina-7 (QUADRO 3).

Cortes histológicos de tonsilas humanas normais foram utilizadas como controle positivo para as galectinas -1 e -3, para a galectina-7, optou-se por cortes histológicos de tecidos compatíveis com hiperplasia fibrosa. Como controle negativo, as amostras foram tratadas como anteriormente descrito, exceto pela omissão dos anticorpos primários no protocolo de imunistoquímica.

Quadro 3. Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectina 1, anti-galectina 3, anti-galectina 7.

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>	60 min
Galectina - 3	(H-160)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Citrato pH 6,0 60 min <i>Steamer</i>	60 min
Galectina - 7	(H-8)	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	Sem tratamento	60 min

A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);
- Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);

- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos)
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Recuperação antigênica (QUADRO 3);
- 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 Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação do anticorpo complemento (*Reveal*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA) por 30 minutos;
- Duas passagens rápidas em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4;
- Incubação do reagente conjugado (*Reveal*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), por 30 minutos;
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- Desidratação em cadeia de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Passagens rápidas em xilol, 2 minutos, cada (3 trocas);
- Montagem em resina *Permout*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

3.7.2 Análise imunoistoquímica

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).

A análise da expressão imunoistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em GPs, CRs e CRRs foi fundamentada na positividade da marcação, sendo consideradas positivas todas as células inflamatórias e epiteliais que apresentaram pigmentos na membrana plasmática, citoplasmáticos e/ou nucleares de coloração acastanhada, independente da instensidade de coloração. A avaliação da expressão imunoistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em GPs, CRs e CRRs 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 de 5 campos microscópicos com maior imunorreatividade para cada componente avaliado (epitelial e conjuntivo) para todas as lesões, 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) no aumento de 400x e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. A expressão imunoistoquímica das galectinas (-1, -3 e -7) foi determinada, com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), a partir da contagem de todas as células presentes em cada campo microscópio, onde foi estabelecido o percentual de células positivas e negativas em relação ao número total de células contadas, bem como a marcação nuclear ou citoplasmática/membranar, adaptando assim, a técnica preconizada por Oliveira et al. (2014).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises morfológicas e imunoistoquímicas foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007®) e posteriormente exportados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 20.0, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas.

Os dados oriundos das análises clínicas e morfológicas foram submetidos à análise estatística descritiva, estabelecendo-se valores médios e percentuais. Os dados obtidos com as análises das imunoexpressões das galectinas foram submetidos ao teste de Kolmogorov-

Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças nas medianas dos percentuais de positividade das galectinas-1, -3 e -7 em relação ao tipo de lesão foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. De forma similar, as comparações das medianas dos percentuais de positividade das galectinas em relação aos parâmetros morfológicos (intensidade do infiltrado inflamatório e espessura do revestimento epitelial) foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Possíveis correlações entre as imunexpressões das galectinas-1, -3 e -7 foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. Em virtude do pequeno número de casos exibindo positividade nuclear em células do tecido conjuntivo, para as galectinas-3 e -7, e em células epiteliais, para as galectinas-1 e -3, os dados obtidos com estas avaliações foram submetidos apenas à análise estatística descritiva. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Artigo

4 ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução deste projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação: **Immunohistochemical analysis of galectins -1, -3 and -7 in periapical granulomas, radicular cysts and residual radicular cysts**. O referido artigo será submetido ao periódico *Journal of Endodontics* (Qualis Odontologia A1), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram em anexo (ANEXO B).

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF GALECTINS -1, -3 AND -7 IN PERIAPICAL GRANULOMAS, RADICULAR CYSTS AND RESIDUAL RADICULAR CYSTS

Autores:

Lívia Natália Sales Brito^I, Lélia Batista de Souza^{II}, Pollianna Muniz Alves^{III}, Cassiano Francisco Weege Nonaka^{III}, Gustavo Pina Godoy^{IV}

^I Mestrado – Programa de Pós-graduação em Odontologia – Universidade Estadual da Paraíba – UEPB – Campina Grande – PB – Brasil.

^{II} Professora Doutora – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal – RN – Brasil.

^{III} Professor Doutor – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Estadual da Paraíba – UEPB – Campina Grande – PB – Brasil.

^{IV} Professor Doutor - Departamento de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife – PE – Brasil.

Autor correspondente:

Gustavo Pina Godoy

Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Patologia Oral

Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 – Cidade Universitária – Recife – PE – Brasil

CEP: 50670-901 e-mail: gruiga@hotmail.com Fone: +55 81 2126-8836 Ramal: 8817.

RESUMO:

Introdução: As galectinas exercem importante papel no desenvolvimento da resposta imunoinflamatória. Todavia, sua participação no desenvolvimento de lesões periapicais ainda não foi esclarecida. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade das galectinas na patogênese das lesões periapicais. **Métodos:** Amostra composta por 20 granulomas periapicais (GPs), 20 cistos radiculares (CRs) e 20 cistos radiculares residuais (CRRs) foi submetida à análise imunoistoquímica utilizando anticorpos anti-galectina-1, -3 e -7. A intensidade do infiltrado inflamatório e o padrão de revestimento epitelial foram os parâmetros morfológicos estabelecidos. **Resultados:** A avaliação imunoistoquímica no componente conjuntivo, demonstrou que os GPs apresentaram uma maior expressão nuclear e citoplasmática/membranar da galectina -1 em células inflamatórias quando comparados aos CRs e CRRs ($p < 0,05$). As lesões que apresentaram inflamação grau III tiveram maior expressão da galectina-1 em ambos componentes celulares ($p < 0,05$). A galectina-3 não demonstrou diferenças estatisticamente significativas nas células inflamatórias ($p > 0,05$). A galectina-7 apresentou nos GPs uma maior imunoexpressão no componente citoplasmático/membranar comparadas aos CRs e CRRs ($p < 0,05$). As lesões com infiltrado inflamatório grau III tiveram maior imunoexpressão da galectina-7 ($p < 0,05$). No componente epitelial, as galectinas -1 e -3 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de imunoexpressão ($p > 0,05$). A galectina-7 apresentou maior percentual de positividade nuclear em CRRs comparadas aos CRs ($p = 0,014$). Lesões com epitélio hiperplásico exibiram maior positividade citoplasmática/ membranar comparadas às atróficas ($p = 0,020$). Independente do tipo de lesão, foram observadas correlações positivas para todas galectinas no componente epitelial e conjuntivo. Assim como correlações positivas entre as galectinas -1 e -7 no tecido conjuntivo ($p < 0,001$). **Conclusões:** As diferenças na expressão imunoistoquímica entre as galectinas -1, -3, e -7 evidenciam a participação destas proteínas na modulação da resposta imunoinflamatória entre lesões periapicais.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, galectinas, granuloma periapical, cisto radicular, cistos maxilomandibulares.

INTRODUÇÃO

A infecção do canal radicular após a necrose pulpar segue um percurso natural no sentido apical, capaz de induzir uma inflamação nas estruturas periapicais. Este processo de agressão pode estimular a destruição dos tecidos periapicais e induzir a perda de estrutura dental, caracterizando uma reabsorção radicular inflamatória apical (1). Com a permanência do estímulo, após a fase aguda, a lesão periapical pode evoluir dando origem a uma das suas formas crônicas: granuloma periapical (GP) ou cisto radicular (CR). A formação destas lesões é modulada por um conjunto de mediadores inflamatórios que se desenvolvem em resposta aos componentes microbianos presentes no canal radicular (2,3). Já os cistos radiculares residuais (CRRs), são cistos periapicais que permanecem nos ossos gnáticos após remoção do dente associado. São histopatologicamente semelhantes aos CRs, contudo, eles não têm qualquer comunicação com o sistema de canais radiculares anteriormente infectado (4).

Dentro dos mecanismos de resposta imune, sabe-se que citocinas estão envolvidas no desenvolvimento e manutenção dos processos inflamatórios crônicos (5). Nesse contexto, as galectinas, proteínas derivadas das lectinas, podem desempenhar diferentes papéis em várias respostas biológicas, tais como a regulação do crescimento celular, da resposta inflamatória e na manutenção da homeostase imune (6 - 9). Contudo, as funções destas proteínas na resposta inflamatória em lesões periapicais ainda não foi elucidada.

As galectinas constituem uma família de lectinas animais e até o momento 15 tipos foram identificados em humanos. Todas elas possuem domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) constituído por cerca de 130 aminoácidos, com afinidade por β -galactosídeos e não possuem uma via clássica de sinalização (7, 10). Elas são proteínas predominantemente intracelulares, sintetizadas nos ribossomos e posteriormente direcionadas para o citosol, para outras organelas citoplasmáticas, bem como para a membrana citoplasmática (6). Porém, também podem ser expressas no meio extracelular (11). É congruente na literatura que as galectinas desempenham papéis fundamentais na homeostase celular durante a resposta imune inata e a adaptativa. Elas podem atuar na regulação da sobrevivência das células, na sinalização, quimiotaxia, crescimento celular, interferindo na secreção de citocinas, assim como na mediação de interações célula-célula e célula-matriz. Todavia, não está claro como diferentes galectinas com semelhantes especificidades de carboidratos podem desencadear efeitos opostos para os mesmos tipos celulares, nem como elas contribuem para a sinalização celular durante infecções (6, 12,13).

Apesar do papel multifuncional no contexto das reações imunoinflamatórias, estudos

comparando a presença de galectinas em lesões periapicais são raros na literatura. Contudo, Oliveira et al.(13) afirmaram que estas moléculas podem representar um importante mecanismo envolvido na regulação da inflamação em lesões periapicais de origem inflamatória. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar a imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7 em GPs, CRs e CRRs e correlacioná-las com a intensidade do infiltrado inflamatório e o padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas, a fim de verificar a participação das galectinas na resposta inflamatória associada ao desenvolvimento destas lesões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da amostra

Amostras teciduais de 60 espécimes, incluindo 20 GPs, 20 CRs e 20 CRRs provenientes dos arquivos do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil, foram selecionadas para este estudo. Os GPs e CRs foram obtidos do periápice de dentes humanos ausentes de tratamento endodôntico prévio e todos os CRRs foram coletados de sítios de extração prévia de dentes afetados por lesões periapicais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (número de protocolo: 51330315.0.0000.5187).

Análise Morfológica

Para o estudo morfológico, cortes com 5µm 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), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise. A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com critérios de Peixoto et al. (14). A partir da porção central dos GPs e da luminal das lesões císticas em direção à periferia, foi considerado 1 campo microscópico, sob o aumento de 200x. Os espécimes cujo infiltrado inflamatório se apresentou restrito a um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I (leve infiltrado); as lesões com células inflamatórias em até 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 padrão do revestimento epitelial foi analisado de acordo com metodologia proposta por Moreira et al. (15). Com base no padrão predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os cistos 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.

Método Imunoistoquímico

A partir do material fixado em formol e embocado em parafina, cortes com 3µm de espessura foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano. Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Sistema de detecção *Reveal*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), utilizando anticorpos monoclonais anti-galectina-1, anti-galectina-3 e anti-galectina-7 (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. Finalmente, os cortes teciduais foram contracolorados com hematoxilina de Mayer e montados com lamínula.

Cortes histológicos de tonsilas humanas normais foram utilizadas como controle positivo para as galectinas -1 e -3, enquanto para a galectina-7, optou-se por cortes histológicos de tecidos compatíveis com hiperplasia fibrosa. 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 dos 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 para cada componente foi determinado em cada campo microscópico, permitindo o cálculo do percentual de células positivas e negativas em relação ao número total de células encontradas, bem como a marcação nuclear ou citoplasmática/membranar.

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). Após análise de normalidade e dados de variância, os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram aplicados. Para análise de possíveis correlações entre as expressões das galectinas foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Em virtude do pequeno número de casos exibindo positividade nuclear em células do tecido conjuntivo, para as galectinas-3 e -7, e em células epiteliais, para as galectinas-1 e -3, os dados obtidos com estas avaliações foram submetidos apenas à análise estatística descritiva. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Análise morfológica

Na análise do infiltrado inflamatório, todos os casos (100%) de GPs foram classificados como grau III. Nos CRs, 16 casos (80%) apresentaram grau III, 2 casos (10%) grau II e 2 casos (10%) grau I. Já nos CRRs, 12 casos (60%) apresentaram grau I, 6 casos (30%) grau III e 2 casos (10%) grau II.

A análise morfológica do revestimento epitelial das lesões císticas revelou, para os CRs, 10 casos (50%) com epitélio atrófico e 10 casos (50%) com epitélio hiperplásico. Nos CRRs, 13 casos (65%) apresentaram padrão atrófico e 7 casos (35%) exibiram padrão hiperplásico.

Análise imunoistoquímica

Galectina-1

Nas células inflamatórias do tecido conjuntivo, foi observada imunorreatividade citoplasmática/ membranar para galectina-1 em todos os casos de GP, CR e CRR. Em relação

à expressão nuclear, todos os GPs e a maioria dos CRs (90%) e CRRs (90%) revelaram positividade para essa proteína (Fig. 1A-C). No componente epitelial, foi constatada expressão citoplasmática/ membranar na maioria dos CRs (90%) e CRRs (70%). Por sua vez, apenas 9 casos (45%) de CRs e 5 casos (25%) de CRRs apresentaram expressão nuclear de galectina-1 em células epiteliais, com percentuais que variaram até 17,3.

Em comparação com CRs e CRRs, os GPs apresentaram maior percentual de positividade para galectina-1, tanto citoplasmática/ membranar ($p < 0,001$) quanto nuclear ($p < 0,001$), em células do tecido conjuntivo (Tabela 2)(Fig. 1A). Lesões com infiltrado inflamatório grau III, quando comparadas com lesões com infiltrado grau I/II, exibiram maior imunoposição de galectina-1, tanto em citoplasma/ membrana ($p = 0,007$) quanto em núcleo ($p = 0,004$) (Tabela 2). Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de positividade para galectina-1 em células do tecido conjuntivo entre lesões com epitélio hiperplásico e com epitélio atrófico ($p > 0,05$) (Tabela 2) (Fig. 1B).

Em relação à imunoposição epitelial, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de positividade citoplasmática/ membranar para galectina-1 entre CRs e CRRs ($p = 0,183$) (Tabela 3). De forma similar, a análise dos percentuais de positividade epitelial, em relação à intensidade do infiltrado inflamatório e à espessura do epitélio de revestimento das lesões císticas, não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 3) (Fig. 1C).

Galectina-3

A análise do tecido conjuntivo revelou imunorreatividade citoplasmática/ membranar para galectina-3 em todos os GPs, bem como na maioria dos CRRs (80%) e CRs (65%) (Fig. 2 A-C). Por outro lado, expressão nuclear dessa proteína em células do tecido conjuntivo foi constatada em apenas 8 casos (40%) de CRRs, 4 casos (20%) de CRs e 4 casos (20%) de GPs. No tecido epitelial, foi constatada expressão citoplasmática/ membranar em 10 casos (50%) de CRs e 13 casos (65%) de CRRs. Por sua vez, apenas 4 casos (20%) de CRs e 4 casos (20%) de CRRs exibiram expressão nuclear de galectina-3 em células epiteliais, com percentuais que variaram até 6,4.

Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de expressão citoplasmática/ membranar da galectina-3 no tecido conjuntivo em relação ao tipo de lesão, à intensidade do infiltrado inflamatório e ao padrão de revestimento epitelial ($p > 0,05$) (Tabela 2) (Fig.2A). De modo semelhante, ao avaliar a imunoposição epitelial, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de positividade

citoplasmática/ membranar para galectina-3 entre CRs e CRRs ($p = 0,237$) (Tabela 3) (Fig.2B). Resultados similares foram constatados em relação à intensidade do infiltrado inflamatório e à espessura do epitélio de revestimento das lesões císticas ($p > 0,05$) (Tabela 3) (Fig.2C).

Galectina-7

No tecido conjuntivo, foi observada expressão citoplasmática/ membranar para galectina-7 em todos os casos de GPs e CRs, bem como na maioria dos CRRs (70%). Por outro lado, expressão nuclear em células do tecido conjuntivo foi constatada em apenas 11 casos (55%) de GP, 4 casos (20%) de CRR e 2 casos (10%) de CR, com percentuais que variaram até 0,3 (Fig.3 A-C). No tecido epitelial, a maioria dos CRs (90%) e CRRs (90%) exibiram expressão citoplasmática/ membranar de galectina-7. Resultados similares foram observados para a expressão nuclear dessa proteína, com positividade na maioria dos CRs (60%) e CRRs (80%).

Quando comparados aos CRs e CRRs, os GPs exibiram maior percentual de positividade citoplasmática/ membranar para galectina-7 em células do tecido conjuntivo ($p < 0,001$) (Tabela 2) (Fig.3A). De modo semelhante, lesões com infiltrado inflamatório grau III, quando comparadas com lesões com infiltrado inflamatório grau I/II, exibiram maior expressão citoplasmática/ membranar de galectina-7 ($p < 0,001$) (Tabela 2). Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de positividade para galectina-7 em células do tecido conjuntivo entre lesões com epitélio hiperplásico e com epitélio atrófico ($p = 0,217$) (Tabela 2).

No tecido epitelial, CRRs revelaram maior percentual de positividade nuclear para galectina-7 quando comparados aos CRs ($p = 0,014$) (Tabela 3) (Fig. 3C). Em relação à intensidade do infiltrado inflamatório e à espessura do revestimento epitelial, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão nuclear de galectina-7 ($p > 0,05$) (Tabela 3). A análise dos percentuais de positividade citoplasmática/ membranar para galectina-7, em relação ao tipo de cisto e à intensidade do infiltrado inflamatório, não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 3). Por outro lado, lesões com epitélio hiperplásico exibiram maiores percentuais de positividade citoplasmática/ membranar estatisticamente significativas quando comparadas às lesões com epitélio atrófico ($p = 0,020$) (Tabela 3) (Fig.3B-C).

Correlação entre as imunorexpressões das galectinas -1, -3 e -7

Para cada uma das galectinas avaliadas, foram observadas correlações positivas, estatisticamente significativas, entre as imunorexpressões nucleares e membranares/citoplasmáticas no tecido conjuntivo ($p < 0,05$) (Tabela 4). Ainda no tecido conjuntivo, foram identificadas correlações positivas entre as imunorexpressões das galectinas-1 e -7 ($p < 0,05$) (Tabela 4). Finalmente, no tecido epitelial, foram constatadas correlações positivas entre as imunorexpressões nucleares e membranares/ citoplasmáticas para cada uma das galectinas analisadas ($p < 0,05$) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Toxinas liberadas no canal radicular infectado representam uma fonte direta de estímulo antigênico em GPs e CRs. Todavia, nos CRRs, a fonte de estímulo antigênico não encontra-se mais presente (16). Como consequência da redução do estímulo antigênico, estudos evidenciam um decréscimo de células e citocinas pró-inflamatórias em CRRs (5,16,17). Considerando que citocinas pró-inflamatórias estão intimamente relacionadas com a intensidade do infiltrado inflamatório (17), os resultados da presente pesquisa evidenciaram que as lesões que exibem a permanência do estímulo antigênico (GPs e CRs) apresentaram, predominantemente, um infiltrado inflamatório de maior intensidade comparados aos CRRs. De modo semelhante, acredita-se que o revestimento epitelial hiperplásico é característico de lesões ativas, contrariamente, epitélios atróficos são característicos de quiescência cística (15,18). O presente estudo observou uma maior quantidade de CRRs com revestimento atrófico, característica esperada uma vez que estas lesões possuem, comparadas aos CRs, uma menor ação de estímulos e fatores de crescimento.

No contexto das moléculas envolvidas em processos imunoinflamatórios, sabe-se que as galectinas são proteínas que podem apresentar-se distribuídas amplamente em diferentes tecidos e tipos celulares. São localizadas principalmente no citoplasma, mas em certas condições, também podem ser expressas no núcleo celular e no meio extracelular, uma vez que elas não possuem uma via clássica de sinalização (7, 19). A galectina-1 é encontrada predominantemente no compartimento intracelular, visualizada no núcleo da célula ou distribuída de forma difusa no citoplasma (6, 20). Essa proteína é amplamente expressa em diversos tipos celulares, como as células de defesa, onde atuam modulando tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (11, 21). Tem sido demonstrado que a galectina-1 afeta a homeostase de células T, modulando a produção de citocinas, proliferação e apoptose (12,

21). Estudos anteriores confirmaram a capacidade desta lectina em induzir a apoptose de células T maduras e imaturas (22, 23, 24).

A galectina-1 é expressa em células estromais do timo e em células T ativadas. No timo, promove apoptose e seleção de células auto-reativas na tolerância central, e na periferia, promove a apoptose de células T ativadas, eliminando a possibilidade de uma resposta exacerbada (25). Ao avaliar a imunopositividade da galectina-1 no tecido conjuntivo das lesões periapicais, foi constatada uma alta expressão tanto nuclear quanto citoplasmática/membranar, sendo significativamente superior em GPs do que em CRs e CRRs. Além disso, ao avaliar esta expressão em relação ao infiltrado inflamatório, as lesões com maior quantidade de células inflamatórias (grau III) apresentaram uma maior positividade para a galectina-1. Observações e interpretações relativas à localização nuclear da galectina-1 são um pouco mais difíceis de serem estabelecidas (6). Porém, sabe-se que em processos inflamatórios, macrófagos ativados, células T antígeno-estimuladas e células B ativadas produzem altos níveis de galectina-1 a fim de eliminar as células T efectoras depois de uma resposta imune. Essa super expressão tem como intuito proteger a integridade e a função dos tecidos, a fim de assegurar a rápida eliminação de células T inflamatórias pela via apoptótica da galectina-1 (12, 20, 26). Destarte, foi considerado que os resultados observados sugerem que a alta expressão citoplasmática/membranar dessa proteína seja uma tentativa de controle local da reação. Resultados semelhantes foram observados por Andrade et al. (5) e Peixoto et al. (14) ao avaliar a expressão do forkhead box P3 (Fox P3), principal fator de transcrição de células T regulatórias (Treg), em lesões periapicais. A maior expressão das células Treg em GPs, quando comparados à CRs e CRRs, também foi sugestiva de uma atividade supressora da reação imunoinflamatória.

As galectinas-1 e -3 são os membros da família das galectinas dotadas de ubiquidade, ou seja, podem ser expressas em diversos locais (27). Em muitas células e tecidos imunes, as galectinas-1 e -3 são co-expressas, dentre estas células, destacam-se as células T, células B, células NK, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos (26). Dentre alguns outros tipos celulares, tais como linfócitos, a galectina-3 não está normalmente expressa, no entanto, sua expressão pode ser induzida por estímulos específicos, tais como ligações cruzadas ao CD3 ou à proteína concavalina A (27).

A galectina-3 pode ser uma proteína reguladora positiva e negativa da resposta inflamatória. No entanto, devido suas múltiplas funções, tem-se revelado difícil demonstrar *in vivo* o mecanismo preciso subjacente ao papel pro ou anti-inflamatório da galectina-3. Observa-se que sua ação depende de múltiplos fatores, tais como seu nível de expressão,

estados inflamatórios específicos, bem como o tipo de célula alvo (27, 28). Dentre as funções intracelulares que a galectina-3 pode desempenhar em reações imunoinflamatórias, estão a modular o reconhecimento de patógenos por meio de glicanos, com posterior desenvolvimento de respostas imunes inatas e adaptativas (28), bem como atuar como uma quimiocina, induzindo a migração de monócitos e macrófagos (19, 26). Estas proteínas também podem participar, através de mecanismos intracelulares, na fagocitose de alguns micro-organismos pelos macrófagos, suscitando na resposta do hospedeiro a patógenos (29).

Apesar da positividade nos GPs, CRs e CRRs, o presente estudo não revelou diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de expressão citoplasmática/membranar da galectina-3 no tecido conjuntivo em relação ao tipo de lesão, à intensidade do infiltrado inflamatório e ao padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas. Em estudo avaliando a expressão da galectina-3 em GPs, CRs e amostras de tecidos pulpaes saudáveis, Oliveira et al. (13) observaram uma alta expressão desta proteína, principalmente, ao comparar GPs e CRs, onde os GPs apresentaram uma expressão estatisticamente superior do que os CRs. Nesse contexto, a alta expressão desta proteína foi considerada associada com a exacerbação da resposta inflamatória para a eliminação das bactérias. Contudo, devido a menor expressão desta proteína no presente estudo, comparada às demais galectinas avaliadas, é sugerido que a galectina-3 desempenha um papel coadjuvante nos mecanismos imunoinflamatórios das lesões periapicais.

Sabe-se que a galectina-7 é uma proteína encontrada principalmente no epitélio escamoso estratificado, cuja expressão está associada com a diferenciação e desenvolvimento dos ceratinócitos (19), em epitélios ceratinizados ou não, e em todos os estágios de diferenciação (30). Todavia, um estudo recente sugeriu que a galectina-7 também pode estar relacionada com respostas imunoinflamatórias, atuando como uma proteína de ligação pró-apoptótica nas células T (31). Diante dos resultados encontrados, sugere-se que a galectina-7 esteja atuando também na apoptose de células inflamatórias em lesões periapicais, uma vez que os GPs exibiram maior percentual de positividade citoplasmática/membranar para esta proteína em células do tecido conjuntivo quando comparados aos CRs e CRRs. Adicionalmente, também foi observada uma maior expressão desta proteína em lesões com infiltrado inflamatório intenso, quando comparadas às lesões com infiltrado leve ou moderado ($p < 0,05$).

No contexto das lesões císticas, ao avaliar as imunoexpressões das galectinas-1, -3 e -7, relacionando com a intensidade do infiltrado inflamatório e o padrão de revestimento epitelial, apenas a galectina-7 apresentou resultados estatisticamente significativos. Estes

resultados corroboram os diversos estudos que relatam funções desta proteína no epitélio escamoso estratificado, tais como o reparo de feridas (9-10) e regulação da apoptose (6, 32). Apesar de ser considerado um marcador de diferenciação dos ceratinócitos, os mecanismos exatos da imunexpressão da galectina-7 em revestimentos epiteliais normais ou patológicos não foram completamente elucidados (9). Estudos prévios confirmam a participação da galectina-7 como moduladora da adesão e proliferação epitelial (9, 33). Desta forma, ao considerar que o padrão de revestimento hiperplásico é representativo de epitélios proliferativos (15, 18), é sugerido que a alta imunexpressão da galectina-7 no epitélio hiperplásico está relacionada com mecanismos de adesão e proliferação do revestimento epitelial.

A galectina-7 é encontrada tanto no núcleo quanto em citoplasma sendo considerada uma proteína pró-apoptótica que pode agir intracelularmente a partir da ativação de JNK (proteína quinase c-Jun N-terminal) e liberação de citocromo *c*. Pode atuar, também, afetando a expressão de alguns produtos de genes que estão relacionados com o estado redox da célula, entre eles, monoamina oxidase B, receptor de rianodina 2 e glutatona-S-transferase Mu 3 (6). Assim, devido a alta expressão nuclear da galectina-7 no epitélio de CRRs, quando comparados aos CRs, sugere-se que sua função esteja relacionada aos mecanismos pró-apoptóticos, o que favoreceria um perfil de epitélio de revestimento mais atrófico. Embora CRs e CRRs compartilhem a mesma origem, CRs possuem um grande potencial de expansão comparado aos CRRs, uma vez que citocinas, tais como VEGF (17, 34), IL-17 (5) e IFN- γ (35) e células T (15), estimuladas pelas endotoxinas, são importantes para proliferação cística (16) à contraparte de CRRs onde o foco de estímulo antigênico não está mais presente.

Ainda no contexto da expressão das galectinas-1, -3 e -7 em GPs, CRs e CRRs, foram observadas correlações positivas entre as expressões nucleares e citoplasmáticas/membranares destas galectinas tanto no revestimento epitelial quanto no tecido conjuntivo. Estes resultados reforçam o nível de complexidade dos eventos biológicos que ocorrem nas lesões periapicais, bem como o pleiotropismo característico destas proteínas, destacados por estudos anteriores (7, 10, 12). Outrossim, destaca-se a correlação positiva entre a expressão das galectinas -1 e -7 no tecido conjuntivo das lesões periapicais. Embasados pelos resultados de estudos anteriores (8, 11, 12, 31), é sugerida a existência de uma via de sinalização comum entre estas duas proteínas, provavelmente relacionada à resposta imune mediada por células T.

A patogênese das lesões periapicais crônicas caracteriza-se por uma complexa interação entre moléculas envolvidas na resposta imunoinflamatória, onde as galectinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune, mas sua real função, nesse

contexto, depende primariamente da sua localização. Dessa forma, o presente estudo destaca a preponderante participação das galectinas -1 e -7 no desenvolvimento de GPs, CRs e CRRs, bem como uma menor participação da galectina-3 na gênese dessas patologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estrela C, Guedes OA, Rabelo LEG, et al. Detection of apical inflammatory root resorption associated with periapical lesion using different methods. *Braz Dent J* 2014; 25:404-8.
2. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 348-81.
3. Marçal JRB, 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; 36:995-9.
4. Lin LM, Ricucci D, Lin J, et al. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. *J Endod* 2009; 35: 607-15.
5. Andrade AL, Nonaka, CFW, Gordón-Núñez MA, et al. Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box P3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *J Endod* 2013; 39: 990-4.
6. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 263-73.
7. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 158-82.
8. Curciarello R, Steele A, Cooper D, et al. The role of galectin-1 and galectin-3 in the mucosal immune response to *Citrobacter rodentium* infection. *PLoS ONE* 2014; 9: e.107933.
9. Gendronneau G, Sanii S, Dang T, et al. overexpression of galectin-7 in mouse epidermis leads to loss of cell junctions and defective skin repair. *PLoS ONE* 2015; 10:e0119031.
10. Panjwani N. Role of galectins in re-epithelialization of wounds. *Ann Transl Med* 2014; 2:89-00.

11. Potikha T, Ella E, Cerliani JP, et al. Galectin-1 is essential for efficient liver regeneration following hepatectomy. *Oncotarget* 2016; [Epub ahead of print].
12. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 274-84.
13. 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.
14. Peixoto RF, Pereira JS, Nonaka CFW, et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol* 2012; 57:1159-64.
15. Moreira PR, Santos DFM, Mantins RD, et al. CD57+ cells in radicular cyst. *Int Endod J* 2000; 33: 99-102.
16. Muglali M, Komerik N, Bulut E, et al. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. *J Oral Pathol Med* 2008; 37:185-9.
17. Nonaka CFW, Maia AP, Nascimento GJF, et al. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106: 896-902.
18. Cury VC, Sette PS, da Silva JV, et al. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod* 1998; 24:36-7.
19. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: 1-24.
20. Elola MT, Chiesa ME, Alberti AF, et al. Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci* 2005; 12: 13-29.
21. Camby I, Mercier ML, Lefranc F, et al. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006; 16:137-57.
22. Rabinovich GA, Riera CM, Sotomayor CE. Galectin-1, an alternative signal for T cell death, is increased in activated macrophages. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:557-67.
23. Zúñiga E, Gruppi A, Hirabayashi J, et al. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and

- survival. *Infect Immun* 2001; 69: 6804-12.
24. Blanchard H, Bum-Erdene K, Bohari MH, et al. Galectin-1 inhibitors and their potential therapeutic applications: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2016; 26:537-54.
 25. Dhirapong A, Lleo A, Leung P, et al. The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmun Rev.* 2009; 8: 360-3.
 26. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23: 313-20.
 27. Dunic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616-35.
 28. Fermino ML, Dylon LSD, Cecílio NT, et al. Lack of galectin-3 increases Jagged1/Notch activation in bone marrow-derived dendritic cells and promotes dysregulation of T helper cell polarization. *Mol Immunol* 2016; 76: 22-34.
 29. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* 2003; 112:389-97.
 30. Magnaldo T, Fowlis D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 1998; 63: 159-68.
 31. Luo Z, Ji Y, Zhou H, et al. Galectin-7 in cardiac allografts in mice: increased expression compared with isografts and localization in infiltrating lymphocytes and vascular endothelial cells. *Transplant Proc* 2013; 45:630-4.
 32. Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, et al. Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 2002; 277: 3487-97.
 33. Chen HL, Chiang PC, Lo CH, et al. Galectin-7 regulates keratinocyte proliferation and differentiation through jnk-mir-203-p63 signaling. *J Invest Dermatol* 2016; 136:182-91.
 34. Leonardi R, Caltabiano M, Pagano M, et al. Detection of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in periapical lesions. *J Endod* 2003; 29:180-3.
 35. Ihan Hren N, Ihan A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol* 2009; 54:156-61.

Tabela1. Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectina 1, anti-galectina 3 e anti-galectina 7.

Especificidad e	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Galectina - 1	(C-45)	Santa Cruz Biotechnology	1:2500	Citrato pH 6,0 60 min <i>Steamer</i>	60 min
Galectina - 3	(H-160)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Citrato pH 6,0 60 min <i>Steamer</i>	60 min
Galectina - 7	(H-8)	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	Sem tratamento	60 min

Tabela 2. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 e significância estatística para as imunorexpressões das galectinas-1, -3 e -7 no tecido conjuntivo de acordo com o tipo de lesão, intensidade do infiltrado inflamatório e espessura do revestimento epitelial.

Variáveis	n	Galectina-1				Galectina-3		Galectina-7	
		Citoplasma		Núcleo		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P
		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P				
<i>Lesão</i>									
GP	20	94,9 (79,6 – 99,6)	<0,001	50,7 (21,3 – 66,6)	<0,001	4,2 (1,8 – 8,2)	0,698	16,5 (3,4 – 35,2)	<0,001
CR	20	59,2 (10,6 – 91,4)		7,9 (1,0 – 28,0)		3,4 (0,0 – 11,6)		5,1 (1,9 – 23,7)	
CRR	20	46,1 (17,5 – 63,6)		4,3 (1,0 – 8,6)		3,8 (0,5 – 9,7)		1,2 (0,0 – 2,5)	
<i>Infiltrado inflamatório</i>									
Grau I/ II	18	53,9 (15,5 – 64,9)	0,007	2,5 (0,9 – 16,6)	0,004	4,1 (0,3 – 13,3)	0,948	1,2 (0,0 – 3,6)	<0,001
Grau III	42	82,7 (28,4 – 94,9)		19,3 (5,4 – 53,4)		4,0 (0,9 – 8,3)		7,3 (2,4 – 26,3)	
<i>Revestimento epitelial</i>									
Atrófico	23	50,7 (15,3 – 67,1)	0,338	3,2 (1,0 – 16,5)	0,318	2,5 (0,0 – 12,1)	0,901	2,0 (0,0 – 12,7)	0,217
Hiperplásico	17	57,2 (15,3 – 92,1)		7,5 (2,7 – 24,8)		3,9 (0,0 – 9,1)		4,4 (1,2 – 11,5)	

Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 e significância estatística para as imunorexpressões das galectinas-1, -3 e -7 no tecido epitelial de acordo com o tipo de lesão, intensidade do infiltrado inflamatório e espessura do revestimento epitelial.

Variáveis	n	Galectina-1		Galectina-3		Galectina-7			
						Citoplasma		Núcleo	
		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P
Lesão									
CR	20	10,3 (1,1 – 25,1)	0,183	0,5 (0,0 – 1,9)	0,237	69,8 (37,5 – 95,5)	0,417	1,0 (0,0 – 26,6)	0,014
CRR	20	4,1 (0,0 – 11,4)		1,0 (0,0 – 5,0)		86,8 (24,0 – 97,5)		37,7 (0,7 – 74,6)	
Infiltrado inflamatório									
Grau I/ II	18	3,6 (0,0 – 15,3)	0,257	1,1 (0,0 – 3,8)	0,258	69,0 (12,6 – 95,5)	0,253	23,5 (0,0 – 47,5)	0,783
Grau III	22	10,6 (1,0 – 23,5)		0,5 (0,0 – 1,5)		82,9 (44,5 – 97,7)		21,0 (0,0 – 52,6)	
Revestimento epitelial									
Atrófico	23	4,5 (0,7 – 27,2)	0,680	1,0 (0,0 – 4,9)	0,195	68,4 (6,5 – 94,1)	0,020	3,9 (0,0 – 39,0)	0,170
Hiperplásico	17	6,3 (0,7 – 15,3)		0,1 (0,0 – 1,0)		95,0 (61,3 – 99,0)		26,6 (0,3 – 72,9)	

Tabela 4. Análise de correlação de Spearman entre as imunorexpressões das galetinas-1, -3 e -7, de acordo com o tipo de tecido.

Galectinas/ tipo de tecido	n	r	P
<i>Tecido conjuntivo</i>			
Galectina-1 (núcleo) x Galectina-1 (citoplasma)	60	0,887	< 0,001
Galectina-1 (núcleo) x Galectina-7 (núcleo)	60	0,345	0,007
Galectina-1 (núcleo) x Galectina-7 (citoplasma)	60	0,366	0,004
Galectina-1 (citoplasma) x Galectina-7 (citoplasma)	60	0,403	0,001
Galectina-1 (citoplasma) x Galectina-7 (núcleo)	60	0,264	0,041
Galectina-3 (núcleo) x Galectina-3 (citoplasma)	60	0,587	< 0,001
Galectina-7 (núcleo) x Galectina-7 (citoplasma)	60	0,591	< 0,001
<i>Tecido epitelial</i>			
Galectina-1 (núcleo) x Galectina-1 (citoplasma)	40	0,556	< 0,001
Galectina-3 (núcleo) x Galectina-3 (citoplasma)	40	0,388	0,013
Galectina-7 (núcleo) x Galectina-7 (citoplasma)	40	0,757	< 0,001

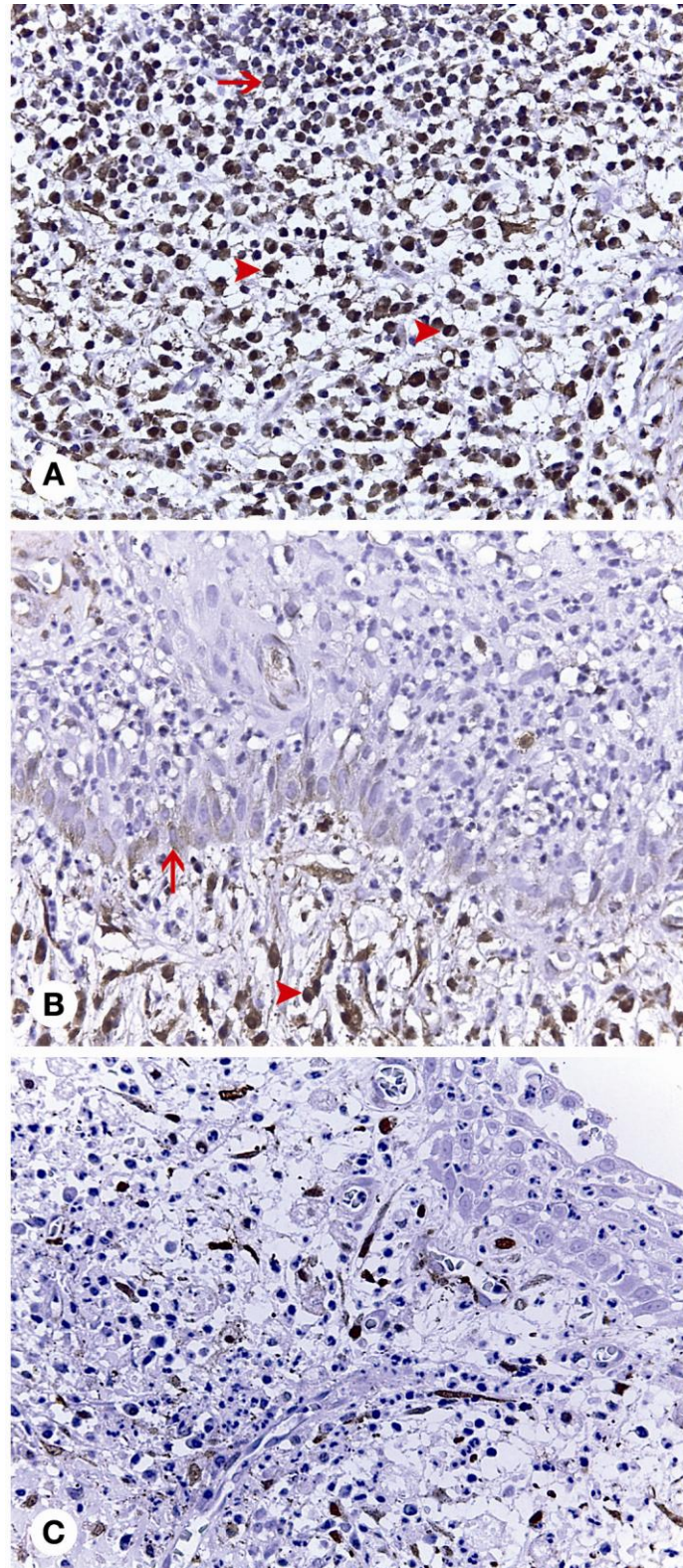


Figura 1. Fotomicrografias representativas da expressão imunoistoquímica da galectina-1. (A) Células inflamatórias do tecido conjuntivo de GP evidenciando expressão citoplasmática/membranar (seta) e nuclear (cabeça de seta) (x400). (B) Expressão citoplasmática/membranar (seta) na camada basal do revestimento epitelial hiperplásico de CR (x400). (C) Ausência de expressão da galectina-1 no revestimento epitelial atrófico de CRR e escassa expressão no infiltrado inflamatório (x400).

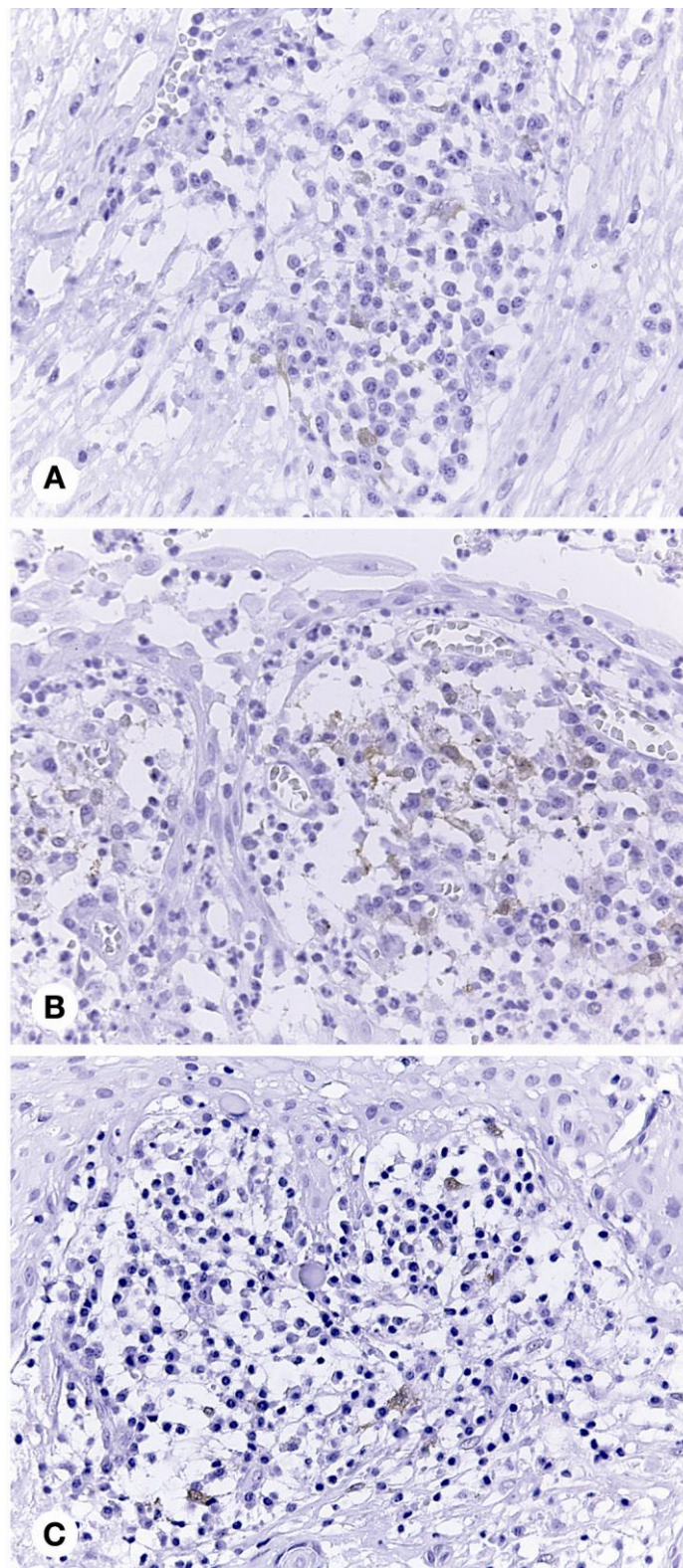


Figura 2. Fotomicrografias representativas da expressão imunohistoquímica da galectina-3. (A) Fraca expressão no infiltrado inflamatório de GP (x400). (B) Ausência de expressão no revestimento epitelial hiperplásico de CR e uma baixa expressão no infiltrado inflamatório (x400). (C) Ausência de expressão no revestimento epitelial hiperplásico de CRR e uma baixa expressão na cápsula fibrosa (x400).

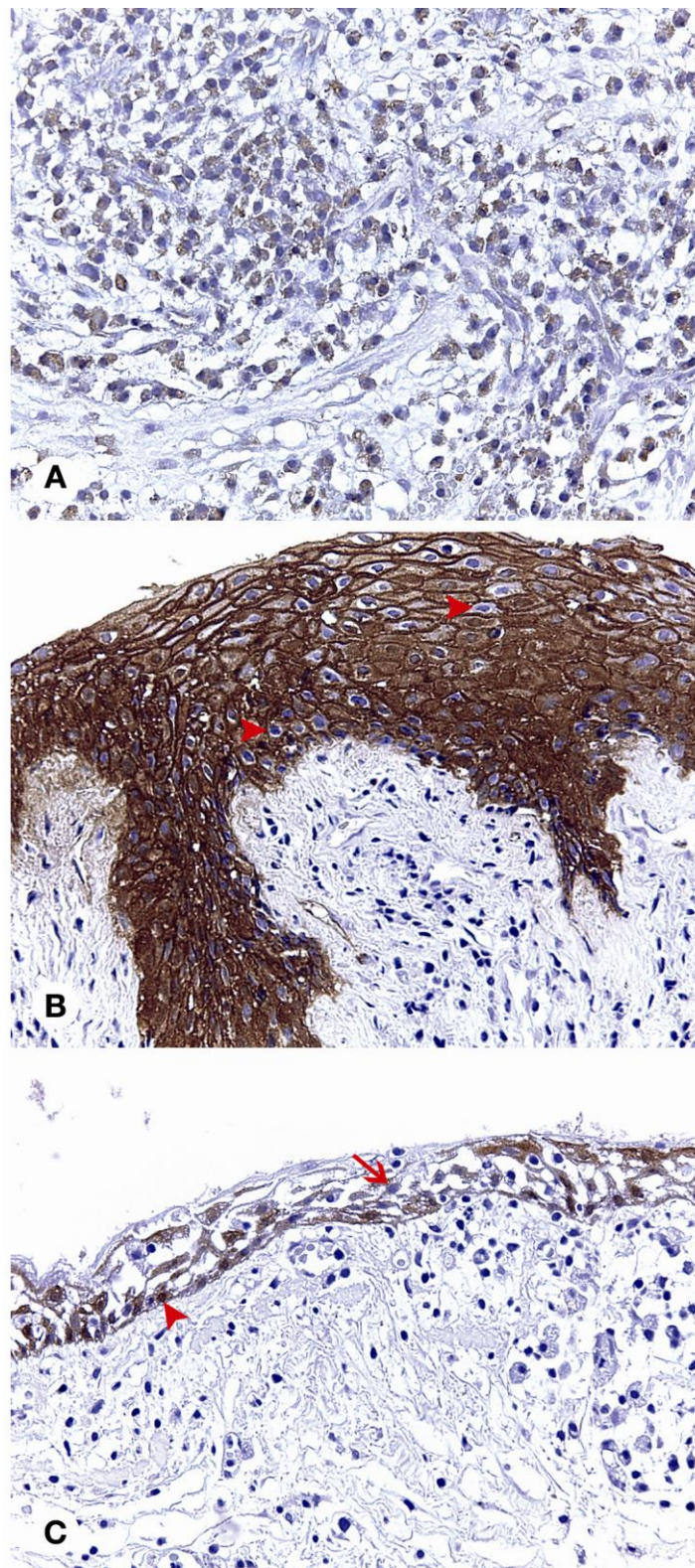


Figura 3. Fotomicrografias representativas da expressão imunoistoquímica da galectina-7. (A) Presença de alta expressão citoplasmática/membranar em células inflamatórias de GP (x400). (B) Alta expressão citoplasmática/membranar no revestimento epitelial hiperplásico de CR, com destaque para áreas ausentes de expressão nuclear (cabeça de seta) (x400). (C) Expressão citoplasmática/membranar (seta) e nuclear (cabeça de seta) no revestimento epitelial atrófico de CRR (x400).

Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lesões periapicais inflamatórias crônicas são desenvolvidas a partir de complexas interações entre células imunoinflamatórias, citocinas e outros elementos inflamatórios, decorrentes da contínua estimulação antigênica advinda dos canais radiculares infectados. Nesse contexto, as galectinas, proteínas que possuem afinidade por β -galactosídeos, podem atuar alterando a resposta imune celular, tanto no meio intracelular, quanto no extracelular, afetando processos como a adesão celular, sinalização, proliferação, diferenciação e apoptose.

Considerando o papel multifuncional das galectinas e diante da falta de mais estudos sobre as mesmas perante as reações inflamatórias em lesões periapicais, os resultados da presente pesquisa contribuem para a um melhor entendimento sobre o papel destas proteínas na modulação das reações inflamatórias em lesões periapicais crônicas. Assim, é sugerido que as galectinas-1 e -7 possuem uma função pró-apoptótica relacionada às células T nas reações inflamatórias em GPs, CRs e CRRs. Ao avaliar o revestimento epitelial, observou-se que a galectina-7 está diretamente relacionada com os mecanismos de adesão e proliferação epitelial em CRs e CRRs. E que a menor expressão da galectina-3, comparadas às demais galectinas, provavelmente relaciona-se a um papel secundário na patogênese dessas doenças.

Portanto, estes resultados alicerçam a realização de novas investigações com o intuito de descrever os mecanismos intrínsecos que estas proteínas elaboram no desenvolvimento das lesões periapicais.

Referências

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.L. et al. Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box p3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **J. Endod.**, v. 39, n. 8, p. 990-4, 2013.
- ARAD, U. et al. Galectin-3 is a sensor-regulator of toll-like receptor pathways in synovial fibroblasts. **Cytokine.**, v. 73, n. 1, p. 30-5, 2015.
- ARANHA, A.M. et al. Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. **J. Endod.**, v. 39, n. 1, p. 83-7, 2013.
- BARONDES, S.H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 33, p. 20807-10, 1994.
- BECCONSALL-RYAN, K.; TONG, D.; LOVE, R.M. Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis. **Int. Endod. J.**, v. 43, n. 10, p. 859-65, 2010.
- BYRNE, A.M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J. Cell. Mol. Med.**, v. 9, n. 4, p. 777-94, 2005.
- CAMPOS, K. et al. DNA methylation of MMP levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions. **J. Endod.**, v. 41, n. 2, p. 212-8, 2015.
- CEDENO-LAURENT, F.; DIMITROFF, C.J. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. **Clin. Immunol.**, v. 142, n. 2, p. 107-16, 2012.
- CHEN, H.Y. et al. Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. **J. Immunol.**, v. 177, n. 8, p. 4991-7, 2006.
- CHIANG, W. F. et al. Overexpression of galectin-1 at the tumor invasion front is associated with poor prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 44, n. 4, p. 325-34, 2008.
- CHO, M.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 10, p. 5198-206, 1995.
- CURCIARELLO, R. et al. The role of galectin-1 and galectin-3 in the mucosal immune response to citrobacter rodentium infection. **Plos One**, v. 9, n. 9, p.e.107933, 2014.
- CURY, V.C.F. et al. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. **J. Endod.**, v. 24, n. 1, p. 36-7, 1998.
- DHIRAPONG, A. et al. The immunological potential of galectin-1 and -3. **Autoimmun. Rev.**, v. 8, n. 5, p. 360-3, 2009.

- DILL, A. et al. Analysis of multiple cytokine polymorphisms in individuals with untreated deep carious lesions reveals il1b (rs1143643) as a susceptibility factor for periapical lesion development. **J. Endod.**, v. 41, n. 2, p. 197-200, 2015.
- DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, n. 4, p. 616-35, 2006.
- ELOLA, M.T. et al. Galectin-1 receptors in different cell types. **J. Biomed. Sci.**, v. 12, n. 1, p. 13-29, 2005.
- ESTRELA, C. et al. Detection of apical inflammatory root resorption associated with periapical lesion using different methods. **Braz. Dent. J.**, v. 25, n. 5, p. 404-8, 2014.
- FUKUMORI, T.; KANAYAMA, H.O.; RAZ, A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Drug Resist. Updat.**, v. 10, n. 3, p. 101-8, 2007.
- GARCÍA, C.C. et al. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 12; n. 8, p. 585-90, 2007.
- GENDRONNEAU, G. et al. Overexpression of galectin-7 in mouse epidermis leads to loss of cell junctions and defective skin repair. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0119031, 2015.
- GROSSMANN, S.M. et al. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 104, n. 6, p. 35-41, 2007.
- HIRABAYASHI, J. et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 232-54, 2002.
- HREN, N.I; IHAN, A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, n. 2, p. 156-61, 2009.
- JOHNSON, N.R. et al. 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. Endod.**, v. 115, n. 4, p. 515-2, 2013.
- KADAM, N.S. et al. Management of large radicular cyst by conservative surgical approach: a case report. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8, n. 2, p. 239-41, 2014.
- KANEKO, T. et al. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in the rat. **J. Endod.**, v. 27, n. 5, p. 337-42, 2001.
- KOIVISTO, T.; BOWLES, W.R.; ROHRER, M. Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: a retrospective analysis of 9,723 cases. **J. Endod.**, v. 38, n. 6, p. 729-32, 2012.
- KUWABARA, I. et al. Galectina-7 (pig1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome C release. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 5, p. 3487-97, 2002.

LEE, R.T. et al. Binding characteristics of galactoside-binding lectin (galaptin) from human spleen. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 14, p. 7864-71, 1990.

LIN, L.M. et al. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. **J. Endod.**, v. 35, n. 5, p. 607-15, 2009.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1183, n.1, p. 158-82, 2010.

LIU, F. T.; PATTERSON, R.J.; WANG, J.L. Intracellular functions of galectins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 263-73, 2002.

LUO, Z. et al. Galectin-7 in cardiac allografts in mice: increased expression compared with isografts and localization in infiltrating lymphocytes and vascular endothelial cells. **Transplant. Proc.**, v. 45, n. 2, p. 630-4, 2013.

MADSEN, P. et al. Cloning, expression and chromosome mapping of human. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 11, p. 5823-9, 1995.

MARÇAL, J.R.B. et al. T-helper cell type 17/regulatory t-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. **J. Endod.**, v. 36, n. 6, p. 995-9, 2010.

MARTÍN-GONZALEZ, J. et al. Expression and immunohistochemical localization of leptin receptor in human periapical granuloma. **Int. Endod. J.**, v. 48, n. 6, p. 611-8, 2015.

MÁRTON, I.J.; KISS, C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. **J. Endod.**, v. 40, n. 2, p. 155-63, 2014.

MOREIRA, P.R. et al. CD57+ cells in radicular cyst. **Int. Endod. J.**, v. 33, n. 2, p. 99-102, 2000.

MUGLALI, M. et al. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 3, p. 185-9, 2008.

NAIR, P.N.R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 6, p. 348-81, 2004.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am. J. Pathol.** v. 156, n. 3, p. 899-909, 2000.

NEVILLE, B.W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 972.

NONAKA, C.F.W. et al. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 106, n. 6, p. 896-902, 2008.

- OLIVEIRA, R.C.M. 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.**, v. 40, n. 2, p. 199-203, 2014.
- OMOREGIE, F.O. et al. Periapical granuloma associated with extracted teeth. **Niger. J. Clin. Pract.**, v. 14, n. 3, p. 293-6, 2011.
- PANJWANI, N. Role of galectins in re-epithelialization of wounds. **Ann. Transl. Med.**, v. 2, n. 9, p. 89-100, 2014.
- PEIXOTO, R.F. et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. **Arch. Oral Biol.**, v. 57, n. 9, p. 1159-64, 2012.
- RABINOVICH, G.A.; RIERA, C.M.; SOTOMAYOR, C.E. Galectin-1, an alternative signal for T cell death, is increased in activated macrophages. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 5, p. 557-67, 1999.
- RABINOVICH, G.A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M.A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 274-84, 2002.
- SARAF, P.A. et al. Comparative evaluation of immunohistochemistry, histopathology and conventional radiography in differentiating periapical lesions. **J. Conserv. Dent.**, v. 17, n. 2, p. 164-8, 2014.
- SELVAMANI, M.; DONOGHUE, M.; BASANDI, P.S. Analysis of 153 cases of odontogenic cysts in a South Indian sample population: a retrospective study over a decade. **Braz. Oral Res.**, v. 26, n. 4, p. 330-4, 2012.
- SHEAR, M.; SPEIGHT, P.M. **Cysts of the oral and maxillofacial regions**. 4 ed. Blackwell, Munksgaard, Oxford, 2007.
- SILVA, T.A. et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 4, p. 306-19, 2007.
- SUKEGAWA, S. et al. Primary intraosseous squamous cell carcinoma of the maxilla possibly arising from an infected residual cyst: a case report. **Oncol. Lett.**, v. 9, n. 1, p. 131-5, 2015.
- SUZUKI, Y. et al. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1783, n. 5, p. 924-34, 2008.
- TAKENAKA, Y. et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 10, p. 4395-406, 2004.

TEIXEIRA-SALUM, T.B. et al. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 39, n. 3, p. 250-6, 2010.

TEN CATE, A.R. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 34, n. 6, p. 956-64, 1972.

TORABINEJAD, M. The rôle of immunological reactions in apical cyst formation and the fate of epithelial cells after root canal therapy: a theory. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 12, n. 1, p. 14-22, 1983.

UEDA, S.; KUWABARA, I.; LIU, F. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. **Cancer Res.**, v. 64, n. 16, p. 5672-6, 2004.

YANG, R.Y.; RABINOVICH, G.A.; LIU, F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 10, n. 17, p. 1-24, 2008.

Apêndices

Anexos

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UEPB

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS (1, 3, 7 E 9) EM GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS RADICULARES RESIDUAIS

Pesquisador: Gustavo Pina Godoy.

CAAE: 51330315.0.0000.5187

SITUAÇÃO DO PROJETO: APROVADO.

Data da relatoria: 02/12/2015

Apresentação do Projeto: Projeto encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba para análise e parecer com fins de elaboração de trabalho de pesquisa junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, da orientanda Livia Natália Sales Brito (Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – UEPB). A presente pesquisa será caracterizada como um estudo descritivo, retrospectivo e correlacional da expressão imuno-histoquímica das galectinas-1, -3, -7 e -9 em GPs, CRs e CRRs. A população deste experimento será formada pelo conjunto de casos de GPs, CRs e CRRs diagnosticados no período de outubro de 2010 a agosto de 2015, pertencentes aos arquivos do Serviço de Anátomopatologia do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). O estudo será realizado com uma amostra de conveniência, constituída por 90 espécimes que terão sido fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina, que serão obtidos a partir dos registros no serviço de Anátomopatologia do Departamento de Odontologia da UEPB. Destes, 30 casos terão sido diagnosticados como GPs, 30 como CRs e 30 casos como CRRs. O projeto em sua totalidade seguirá as diretrizes da Resolução 466/12 do CNS/MS.

Objetivo da Pesquisa: avaliar a expressão imunoistoquímica das galectinas -1, -3, -7 e -9 em GP, CR e CRR, correlacionando-as com o tipo de lesão, a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo, bem como com a espessura do revestimento epitelial nas lesões císticas com os aspectos morfológicos destas lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: A coleta de dados será do tipo documental e acontecerá nos Arquivos do Serviço de Anátomopatologia do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), logo após será realizada imunoistoquímica das lesões coletadas, sendo assim, não há riscos para os sujeitos da pesquisa. Não há benefícios diretos para os sujeitos da pesquisa, porém, o conhecimento sobre o papel destas lectinas na modulação das reações inflamatórias em lesões periapicais crônicas é importante uma vez que estas lesões apresentam uma alta ocorrência na população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A presente proposta de pesquisa é de suma importância quanto papel e atribuições das Instituições de Ensino Superior (IES), mormente pesquisa (bem como extensão), estando dentro do perfil das pesquisas de construção do ensino-aprendizagem significativa, perfilando a formação profissional baseada na tríade conhecimento-habilidade-competência, preconizada pelo MEC. Portanto, tem retorno social, caráter de pesquisa científica e, contribuição na formação de profissionais da pós-graduação em odontologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos necessários e obrigatórios encontram-se presentes.

Recomendações: Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

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 trails, 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, consultantships, 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>.