



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE MESTRADO**

CATARINA PEREIRA MONTEIRO LIMA

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES DA VIA DE
SINALIZAÇÃO WNT (Wnt10b e β -catenina) EM GRANULOMAS
PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E
CISTOS RADICULARES RESIDUAIS**

CAMPINA GRANDE/PB

2021

CATARINA PEREIRA MONTEIRO LIMA

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES DA VIA DE
SINALIZAÇÃO WNT (Wnt10b e β -Catenina) EM GRANULOMAS
PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E
CISTOS RADICULARES RESIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Estudo das alterações do sistema estomatognático.

Orientadora: Prof.^a Dra. Pollianna Muniz Alves

CAMPINA GRANDE/PB

2021

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

L732a Lima, Catarina Pereira Monteiro.
Análise imunoistoquímica de marcadores da via de sinalização WNT (WNT10b e B-catenina) em granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos radiculares residuais [manuscrito] / Catarina Pereira Monteiro Lima. - 2021.
87 p. : il. colorido.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.
"Orientação : Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves ,
Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
1. Cisto radicular. 2. Granuloma periapical. 3. Via de sinalização WNT. 4. Beta-Catenina. I. Título
21. ed. CDD 616.994

CATARINA PEREIRA MONTEIRO LIMA

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES DA VIA DE
SINALIZAÇÃO WNT (Wnt10b e β -Catenina) EM GRANULOMAS
PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E
CISTOS RADICULARES RESIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Estudo das alterações do sistema estomatognático.

Aprovada em: 16/ 12/ 2021

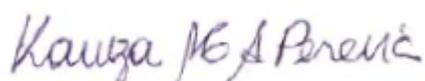
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Pollianna Muniz Alves (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico esse trabalho e todas as minhas conquistas a minha mãe, que sempre esteve e está comigo, apoiando meus voos e sendo morada de sentimentos bons. Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A professora **Pollianna Muniz**, meu imenso agradecimento por ser minha orientadora e me guiar durante todo esse tempo de pesquisa, comandar o barco do meu aprendizado, seja no laboratório ou nas aulas. Seu jeito particular de ser me ensinou muito e me motivou a ser melhor a cada dia. Obrigada por segurar minha mão e me ajudar a evoluir, pela paciência para comigo quando eu cheguei meio “perdida” no laboratório e aceitou minhas sugestões de trabalhar com o que eu gostava e estar sempre disposta a me ajudar em tudo que eu tivesse dúvidas. Minha eterna gratidão.

Ao professor **Cassiano Nonaka**, meu agradecimento especial por ter me acolhido no laboratório, ter sido tão paciente diante das minhas dúvidas e minha pesquisa e persistente quanto aos meus anticorpos. Obrigada por todo o apoio, ensinamentos passados e mostrados em cada palavra e gesto o seu amor pela Patologia Oral e pela pesquisa. Guardarei sempre seu exemplo de professor para comigo.

A minha mãe, **Claudinete**, por ser fonte de inspiração, amor, paciência e ser casa de sentimentos bons, mulher, guerreira, que me acolhe a cada dia e desde o meu nascimento apoia meus sonhos, me acolhe nas derrotas e comemora todas as vitórias, por menores que elas sejam. Obrigada por me dar asas e me ensinar a voar para seguir meus sonhos, teu apoio me ensinou a voar atrás do que eu desejo e em teu colo sei que tenho um porto seguro quando as correntes de ar me tirarem dos meus planos. Meu mundo não seria tão bonito e tão estruturado sem teu amor e zelo pelo que eu sempre quis para mim. Teu amor me move a continuar sendo melhor a cada dia e teu exemplo me norteia de quem eu escolhi ser e quais as batalhas que eu escolho lutar e conquistar. Grata a Deus por ser tua filha e ter tanto de você em mim.

A **Deus**, toda honra e glória por ter conquistado cada benção durante esse tempo e a realização desse sonho que é a pós-graduação. Grata por todas as vezes que mesmo diante de todas as tribulações seguraste minha mão e me ensinastes que eu deveria ser forte e corajosa, seguir mesmo em meio ao caos que o mundo se transformou alguns meses após iniciar o mestrado. Por manter minha fé mesmo quando tudo parecia desabar diante de meus olhos e me deixar sem esperança a respeito do meu futuro muitas vezes. Obrigada por ser fortaleza e me ensinar a ser forte mesmo em meio a minha aridez espiritual durante alguns períodos.

Nossa Senhora das Graças, minha eterna intercessora, mãe, virgem, protetora, por quem tenho grande devoção e quem me carrega no colo com seu amor materno. Obrigada por interceder por minha vida e por minhas decisões, por me mostrar que meu sonho sempre foi possível, que meu milagre foi recebido todos os dias em que eu pude acordar e realizar meus sonhos. Teu amor puro me ensinou tanto sobre quem eu devo e quero ser. Foste porto seguro nas horas difíceis e brisa leve quando tudo se acalmou.

Aos meus avós, **João Pereira**, **Antonieta Monteiro** e **Raimunda Lima**, obrigada por confiarem em mim, me estimularem sempre a seguir meus sonhos e me animarem sempre quando algo me preocupava. Obrigada por tanto amor e dedicação para comigo. As minhas tias, **Claudicea**, **Claudineide**, **Fabiana**, vocês são apoio e sempre foram de enorme amor comigo. Obrigada por me apoiarem tanto nessa caminhada, sem vocês, seu bom humor e sua preocupação tudo seria mais difícil.

Aos meus irmãos, **Caroline, Jefferson e Maklyste**, obrigada por sempre acreditarem em mim como pessoa e como profissional. Vocês fizeram parte dessa caminhada junto comigo, me apoiando e torcendo sempre por minhas conquistas. Obrigada por compreenderem sempre a minha rotina corrida e persistirem em estar ao meu lado sempre, vocês são bênçãos de Deus na minha vida. Jefferson e Maklyste, obrigada por me darem os melhores sobrinhos que eu poderia ter, Matheus e Otávio inundam meus dias de alegria com suas risadas e brincadeiras, aliviando por vezes as tensões da minha rotina. As minhas cunhadas **Raquel e Priscila** por estarem sempre ao meu lado e serem de enorme força sempre. Amo vocês!

Ao pessoal do laboratório, nas pessoas de **Christany Rodrigues, Allany Andrade, Luan Éverton e Lívia Brito**. Vocês foram essenciais na minha caminhada, os dias de imuno não seriam os mesmos sem vocês. Muito mais que imunoistoquímica, me ensinaram a fortalecer laços, seguir meus sonhos, valorizar os momentos vividos e mais ainda, a sorrir diante de tudo que nos acontece. Cada um, de sua forma singular, será lembrado em minha história. Obrigada por me aceitarem em minha complexidade e por terem vivido tantos dias complicados em meio a essa pandemia e ter mantido o bom humor. Obrigada por serem grandes apoiadores da minha caminhada. Em especial Allany, por ter compartilhado tantos momentos e tantas confissões, obrigada por me ajudar em cada célula contada, cada palavra partilhada e cada sonho sonhado juntas.

Ao meu eterno grupo da graduação, **Anny Kallynne, Luizy Barbosa, Polion Neto e Válerly Muniz**, muito obrigada por sempre me apoiarem, darem boas risadas comigo e acreditarem sempre no quanto eu podia e posso ir mais longe, vocês fazem parte dessa conquista, cada um à sua maneira. Grata pela lealdade mesmo com a distância e nosso tempo atribulado.

Aos meus amigos do peito **Gabriel Barbosa, Malu Rodrigues, Helen Barbosa, Rafa Pequeno e Caroline Truta**, obrigada por sempre acreditarem que eu posso mais, uma amizade forjada na sinceridade, apoio e em Deus. Mesmo em meio a tantas dificuldades como a pandemia, nos aproximamos e nos reinventamos diante de tudo. Gabriel, sua alegria trouxe cores e confiança para os dias mais nublados de indecisão. Malu, você me traz o exemplo de confiança e empoderamento que eu sempre precisei. Helen, você me trouxe a tranquilidade e a certeza de que tudo daria certo, mas antes teríamos algumas noites mal dormidas (risos). Rafa, companheira de Odonto, da igreja e da vida, me ensina sempre a “continuar nadando” e acreditando em meus sonhos. Carol, sua vibe maravilhosa me fez sempre pensar em evoluir e saber que eu conseguiria você sempre viu em mim a força que eu nem sabia que tinha.

A **Tayná Figueiredo e Eline Moura**, obrigada por serem minhas confidentes, estarem presentes em tantos momentos mesmo em meio à distância que a pandemia nos impôs. As nossas conversas foram fonte de incentivo e boas gargalhadas, vocês trouxeram leveza para meu dia a dia que por vezes estava muito pesado, deixaram meus dias mais coloridos e sempre reforçaram a capacidade de se reinventar e tornar as coisas melhores.

As técnicas do laboratório, nas pessoas de **Ana Luzia e Denize Núbia**, cada uma a sua maneira alegrou o nosso dia e nos trouxe ensinamentos para toda uma vida.

A **Emanuelle**, que ao longo desses dois anos tem me ajudado de forma mais que preciosa me escutando, aconselhando e me ajudando a vencer meus medos e bloqueios nas mais diversas situações que eu encontrei por esse caminho. Sua docilidade e seu carinho me fizeram calma em meio às tribulações que passei.

Aos amigos do pilates, **Camila, Danielle, Deborah, Fabiano, Klerysson e Kiara**, obrigada pelo apoio de sempre e pelas palavras positivas e orações direcionadas a mim e a essa conquista, vocês fazem parte daqueles que tem um pedaço do meu coração.

Aos professores do PPGO/UEPB, nas pessoas de **Daniela Pita, Ana Flávia Granville-Garcia e Edja Costa** que sempre nos apoiaram para seguirmos na carreira acadêmica e mais que isso, demonstram amor e carinho em tudo o que fazem.

A **Ahyanna**, por estar sempre disposta a ajudar e solucionar qualquer problema ou requisição que tive durante esse tempo no mestrado.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro durante todo o período do mestrado.

A **UEPB**, por todo o apoio concedido a minha pesquisa.

Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito,
e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer
terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?

Fernando Pessoa SOARES, B. Livro do Desassossego.
Vol.II. Lisboa: Ática. 1982. 85p.

RESUMO

Introdução: A via de sinalização WNT/ β -Catenina, está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, no entanto, sua participação na reabsorção óssea decorrente das lesões periapicais ainda não é completamente elucidada. **Objetivos:** Avaliar as imunoexpressões do Wnt10b e da β -catenina em granulomas periapicais (GPs), cistos radiculares (CRs) e cistos radiculares residuais (CRRs), correlacionando-as com o padrão de revestimento epitelial e o grau de infiltrado inflamatório. **Materiais e métodos:** 60 espécimes (20 GPs, 20 CRs e 20 CRRs) foram selecionados para realização de análise morfológica, de acordo com o tipo de epitélio (atrófico/ hiperplásico) e grau de infiltrado inflamatório (grau I, II e III). A análise imunoistoquímica com os anticorpos anti β -Catenina e anti-Wnt10b foi avaliada em epitélio e tecido conjuntivo, de forma quantitativa, considerando o compartimento celular (núcleo, citoplasma e membranas). Para a análise estatística, utilizaram-se os testes de Mann-Whitney e Correlação de Spearman, considerando a significância de $p < 0,05$. **Resultados:** Em relação à β -catenina no tecido conjuntivo, observou-se imunoexpressão citoplasmática em todos os casos de GP, CR e CRR, e com expressão significativamente maior em CR, tanto em citoplasma quanto em núcleo ($p < 0,05$). No revestimento epitelial, evidenciou-se predomínio de imunoexpressão membranar e citoplasmática na maioria dos CRs e CRRs, e com expressão significativamente maior em CR, tanto em membrana quanto em citoplasma ($p < 0,05$). Houve também associação significativa da imunoexpressão citoplasmática da β -catenina nas lesões com infiltrado inflamatório grau III ($p < 0,05$). Em relação ao Wnt10b no tecido conjuntivo, observou-se predomínio de imunoexpressão citoplasmática e nuclear nos casos de GP, CR e CRR, e com expressão significativamente inferior em CRR quando comparados ao GP e CR, tanto em citoplasma quanto em núcleo ($p < 0,001$). No revestimento epitelial, evidenciou-se que os CRRs apresentaram maior expressão citoplasmática e menor expressão nuclear para Wnt10b ($p < 0,05$). Houve associação significativa da imunoexpressão citoplasmática do Wnt10b com lesões de infiltrado inflamatório grau III ($p < 0,05$) e imunoexpressão membranar com cistos de epitélio hiperplásico ($p < 0,05$). **Conclusão:** Evidenciou-se participação da via de sinalização Wnt10b/ β -catenina no desenvolvimento das lesões periapicais, sugerindo um possível papel pró-inflamatório.

Palavras-chave: Granuloma periapical, Cisto radicular, Beta catenina, Via de sinalização WNT.

ABSTRACT

Introduction: WNT/ β -Catenin signaling pathway is involved for several physiological and pathological processes, however its participation in bone resorption resulting from periapical lesions still remains to be uncompletely elucidated. **Objectives:** To evaluate the immunoexpression of Wnt10b and β -Catenin in periapical granulomas (PGs), radicular cysts (RCs) and residual radicular cysts (RRCs), correlating them with the pattern of epithelial lining and the degree of inflammatory infiltrate. **Materials and methods:** 60 specimens (20 PGs, 20 RCs and 20 RRCs) were selected for morphological analysis, according to the type of epithelium (atrophic/hyperplastic) and degree of inflammatory infiltrate (grade I, II and III). Immunohistochemical analysis with anti- β -Catenin and anti-Wnt10b antibodies was quantitatively evaluated in epithelium and connective tissue, considering the cell compartment (nucleus, cytoplasm and membrane). For statistical analysis, the Mann-Whitney and Spearman correlation tests were used, considering the significance of $p < 0.05$. **Results:** Regarding β -catenin in connective tissue, cytoplasmic immunoexpression was observed in all cases of PG, RC and RRC, with significantly higher expression in RC, both in cytoplasm and in nucleus ($p < 0.05$). In the epithelial lining, there was a predominance of membrane and cytoplasmic immunoexpression in most RCs and RRCs, and with significantly higher expression in RC, both in membrane and in cytoplasm ($p < 0.05$). There was also a significant association of β -catenin cytoplasmic immunoexpression in lesions with grade III inflammatory infiltrate ($p < 0.05$). Regarding Wnt10b in connective tissue, there was a predominance of cytoplasmic and nuclear immunoexpression in cases of PG, RC and RRC, and with significantly lower expression in RRC when compared to PG and RC, both in cytoplasm and in nucleus ($p < 0.001$). In the epithelial lining, it was evidenced that RRCs had higher cytoplasmic expression and lower nuclear expression for Wnt10b ($p < 0.05$). There was a significant association of Wnt10b cytoplasmic immunoexpression with grade III inflammatory infiltrate lesions ($p < 0.05$) and membrane immunoexpression with hyperplastic epithelial cysts ($p < 0.05$). **Conclusion:** The participation of WNT10b/ β -Catenin signaling pathway was evidenced in the pathogenesis of periapical lesions, and it suggests your possible role pro-inflammatory.

Keywords: Periapical granuloma, Radicular cyst, Beta catenin, WNT signaling pathway.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB	Adenoma de Célula Basais
ACCB	Adenocarcinoma de Células Basais
AME	Ameloblastoma
AP	Adenoma Pleomórfico
APC	Do inglês “ <i>Adenomatous polyposis coli</i> ” traduzido como Proteína da Adenomatose Poliposa de Cólon
ATM	Articulação Temporomandibular
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CK1	Do inglês “ <i>Casein kinase 1</i> ” traduzido como Caseína Cinase 1
CR	Cisto Radicular
CRR	Cisto Radicular Residual
CTNNB1	Gene <i>CTNNB1</i> referente a β -catenina 1
DKK-1	Do inglês “ <i>Dickkopf-1</i> ”, referente ao membro 1 da família Dickkopf que são inibidores da via de sinalização WNT.
DKK-2	Do inglês “ <i>Dickkopf-2</i> ”, referente ao membro 2 da família Dickkopf que são inibidores da via de sinalização WNT.
DKK-3	Do inglês “ <i>Dickkopf-3</i> ”, referente ao membro 3 da família Dickkopf que são inibidores da via de sinalização WNT.
DKK-4	Do inglês “ <i>Dickkopf-4</i> ”, referente ao membro 4 da família Dickkopf que são inibidores da via de sinalização WNT.
DSH	Do inglês “ <i>Dishelved</i> ” é referente a proteína que se liga ao receptor da via WNT.
FZD	Do inglês “ <i>Frizzled</i> ”, referente a um receptor da via de sinalização canônica WNT
GP	Granuloma Periapical
GSK3 β	Do inglês “ <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i> ” traduzido como Glicogênio Sintase Cinase 3 β
IL-1 β	Do inglês “ <i>Interleukin 1 beta</i> ” traduzido como Interleucina 1 beta

LO	Leucoplasia Oral
LRP	Do inglês <i>Lipoprotein receptor – related protein</i> , traduzido como Receptor Lipoproteico de Baixa Densidade
NF-κB	Do inglês “ <i>Nuclear factor kappa B</i> ” traduzido como Fator Nuclear Kappa B
OPG	Do inglês “ <i>Osteoprotegerin</i> ” traduzido como Osteoprotegerina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCP	Do inglês “ <i>planar cell polarity</i> ” traduzido como polaridade de célula planar
PCR	Do inglês “ <i>polymerase chain reaction</i> ” traduzido como Reação em cadeia da polimerase
RANKL	Do inglês “ <i>receptor activator of nuclear fator kappa B-ligand</i> ” traduzido como receptor ativador de fator nuclear Kappa B Ligante
SPSS	Do inglês “ <i>Statistical Package for Social Sciences</i> ”, traduzido como Programa Estatístico para Ciências Sociais
TCF/LEF	Do inglês “ <i>T-cell factor/lymphoid enhancer fator</i> ” traduzido como fator de células T/fator potenciador linfoide
Trap5b	Do inglês “ <i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i> ” traduzido como fosfatase ácida resistente ao tartarato
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
WNT	Grupo de vias de sinalização
WNT1	Proteína da família WNT do subtipo 1
WNT2	Proteína da família WNT do subtipo 2
WNT3	Proteína da família WNT do subtipo 3
WNT3a	Proteína da família WNT do subtipo 3a
WNT5A	Proteína da família WNT do subtipo 5a
WNT6	Proteína da família WNT do subtipo 6
WNT7a	Proteína da família WNT do subtipo 7a
WNT7b	Proteína da família WNT do subtipo 7b
WNT9a	Proteína da família WNT do subtipo 9a

WNT9b	Proteína da família WNT do subtipo 9b
WNT10b	Proteína da família WNT do subtipo 10b

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes que foram analisadas no estudo.....	35
Quadro 2. Elenco de variáveis independentes que foram analisadas no estudo.....	35
Quadro 3. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo	37

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Via de sinalização WNT	23
Figura 2	Fig 2. A e D) Fotomicrografia exibindo intensa imunexpressão predominantemente citoplasmática da β -catenina e Wnt10b em células inflamatórias e endoteliais em GP (<i>Amplifier</i> , 100X e, em destaque, 400X). B e E) Imunoexpressão predominantemente citoplasmática e membranar da β -catenina e Wnt10b em epitélio hiperplásico de CR, e citoplasmática nas células inflamatórias e células endoteliais (<i>Amplifier</i> , 200X). C e F) Imunoexpressão predominantemente citoplasmática e membranar da β -catenina e Wnt10b em epitélio atrófico de CRR, e citoplasmática em infiltrado inflamatório grau I (<i>Amplifier</i> , 200X).....	51
Figura 3	Gráficos de box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para β -Catenina na cápsula (A) e no revestimento epitelial (B) dos GP, CR e CRR.....	49
Figura 4	Gráficos de box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para Wnt10b na cápsula (A) e no revestimento epitelial (B) dos GP, CR e CRR.....	52
Figura 5	Gráfico de box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para β -Catenina e Wnt10b nos compartimentos membranares, citoplasmáticos e nucleares no tecido conjuntivo (A) e no epitélio (B) dos GP, CR e CRR relacionando-os ao grau de infiltrado inflamatório.....	53
Figura 6	. Gráfico de box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para β -Catenina e Wnt10b nos compartimentos membranares, citoplasmáticos e nucleares no tecido conjuntivo (A) e no epitélio (B) dos GP, CR e CRR relacionando-os ao revestimento epitelial.....	54

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Distribuição dos casos de GP, CR e CRR de acordo com as características clinicopatológicas.....	48
Tabela 2	Tamanho da amostra, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas para β -catenina e Wnt10b no tecido conjuntivo em relação aos grupos de lesões e características histopatológicas.....	55
Tabela 3	Tamanho da amostra, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas para β -catenina e Wnt10b no tecido epitelial em relação aos grupos de lesões e características histopatológicas.....	56

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	19
1.2 Via de Sinalização WNT	21
1.3 Via de sinalização WNT/ β -catenina no desenvolvimento de lesões odontogênicas	25
1.4 Via de sinalização Wnt/ β -catenina e seu inibidor DKK-1 no desenvolvimento de lesões periapicais	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Aspectos éticos	32
4.2 Caracterização do estudo	32
4.3 População	32
4.4 Amostra	33
4.4.1 Critérios de inclusão	33
4.4.2 Critérios de exclusão	33
4.5 Variáveis	33
4.6 Estudo clínico	35
4.7 Estudo morfológico	35
4.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	36
4.8.1 Método imunoistoquímico	36
4.8.2 Análise imunoistoquímica	38
4.9 Análise estatística	39
5 ARTIGO	40
5.1 Apresentação	40
5.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO	41
5.2.1 RESUMO	42
5.2.2 Introdução	42
5.2.3 Materiais e métodos	44
5.2.4 Resultados	46
5.2.5 DISCUSSÃO	56
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62

APÊNDICES	68
APÊNDICE A.....	68
APÊNDICE B.....	69
ANEXOS	70
ANEXO A - Parecer do comitê de Ética em Pesquisa da UEPB	70
ANEXO B – Normas para submissão de trabalhos ao periódico Journal of Endodontics.	73

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Lesões periapicais crônicas

Lesões periapicais correspondem a uma reação inflamatória ao redor do ápice dental, causadas por uma infecção bacteriana do sistema de canais radiculares. É resultado de uma complexa interação de comunicação celular, necessária para a regulação funcional e integração das células do sistema imunológico com os microrganismos envolvidos na infecção radicular (NAIR, 2004; TAVARES *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2017; ALVARES *et al.*, 2018). As bactérias e seus produtos tóxicos, que estão dentro dos canais radiculares, progridem através do forame apical levando a uma inflamação do tecido conjuntivo periapical, sob a forma de um abscesso ou lesão aguda (NAIR, 2004; GARCIA *et al.*, 2007. LIN *et al.*, 2007). Uma vez que haja continuação do estímulo, a lesão pode evoluir dando origem a uma das suas formas crônicas, que correspondem aos granulomas periapicais (GP) e cistos radiculares (CR) (ANDRADE *et al.*, 2013; ALVARES *et al.*, 2017). Os cistos radiculares residuais (CRR) correspondem a CR que permanecem nos ossos gnáticos, após remoção do dente associado (ANDRADE *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2017; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020).

O GP é definido como uma massa de tecido conjuntivo fibrovascular, formada por uma reação secundária e defensiva do hospedeiro, na tentativa de controlar a progressão do processo infeccioso provocado por injúrias à polpa dentária (GRAUNAITE, LODIENE, MACIULSKIENE, 2011; WEBER *et al.*, 2019). Essa lesão é diagnosticada em pacientes numa ampla faixa etária (5 a 81 anos), sendo mais frequente na quarta década de vida (CALISKAN *et al.*, 2016). Clinicamente é caracterizado como uma lesão assintomática, podendo ter relato de episódios esporádicos de agudização associado com infecção secundária (FERREIRA, ROSIN, CORRÊA, 2016). Radiograficamente, mostra uma lesão radiolúcida bem delimitada com margens escleróticas (BANICA *et al.*, 2018).

Histopatologicamente, o GP consiste em um tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório, predominantemente, mononuclear permeado a um tecido conjuntivo fibroso denso vascularizado, tendo em alguns casos restos epiteliais de Malassez (NAIR, 2004; MUGLALI *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2013; FERREIRA, ROSIN, CÔRREA, 2016; BANICA *et al.*, 2018; KAMMER, MELLO, RIVERO,

2020). Áreas focais de intenso infiltrado inflamatório neutrofílico, no tecido de granulação, podem ser observadas, algumas vezes nos casos de GP com exacerbação aguda (FERREIRA, ROSIN, CÔRREA, 2016). Em relação ao tratamento necessário, primeiramente aborda-se pela terapia endodôntica convencional para controle da população microbiana. Não obtendo sucesso, recomenda-se uma cirurgia periapical (NAIR, 2004; WEBER *et al.*, 2019).

Os CR são cistos odontogênicos de origem inflamatória, associados a um dente não-vital (NAIR, 2004; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). É considerado o cisto inflamatório mais prevalente e responsável por cerca de metade da incidência (46,06%) de lesões císticas nos maxilares (MUGLALI *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2014; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Assim como o GP, o CR é assintomático e descoberto em radiografias de rotina (SPEIGHT, SOLUK, 2017).

Os CRR são cistos que permanecem nos ossos gnáticos após a remoção do dente ao qual estavam associados e não foram removidos adequadamente com a curetagem (NAIR, 2004; ANDRADE *et al.*, 2013; SPEIGHT, SOLUK, 2017; MARTINS *et al.*, 2017; DESSAUNE NETO *et al.*, 2018; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Os CRR são considerados lesões intraósseas que podem regredir espontaneamente ou atingir grandes dimensões, causando expansão óssea (ANDRADE *et al.*, 2017). Diferentemente dos CR, os CRR não possuem comunicação com o sistema de canais radiculares infectados (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; MUGLALI *et al.*, 2008).

No que diz respeito às características histopatológicas dos CR, observa-se que são lesões caracterizadas por uma cavidade cística revestida por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado com graus variados de hiperplasia, e, por vezes, com projeções arciformes, podendo exibir áreas de espongiose, degeneração hidrópica, exocitose e corpúsculos de Rushton (NAIR, 2004; MARTINS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017b; NGOC *et al.*, 2019; WEBER *et al.*, 2019). Outras alterações incluem metaplasia mucosa com células caliciformes, ciliadas ou pequenas áreas de queratinização (SPEIGHT, SOLUK, 2017). A cápsula cística é constituída por tecido conjuntivo fibroso, permeado por um infiltrado inflamatório crônico, que pode exibir macrófagos espumosos, depósitos de hemossiderina, corpúsculos de Russell, calcificações distróficas, bem como espaços negativos de cristais de colesterol (NAIR, 2006). Os CRRs exibem características histopatológicas semelhantes ao CR, sendo que, na maioria dos casos podem apresentar um epitélio de revestimento pavimentoso

estratificado não ceratinizado mais atrófico, e com cápsula cística exibindo infiltrado inflamatório crônico em menor intensidade (NAIR *et al.*, 2004).

O tratamento das lesões periapicais consiste na remoção do hospedeiro (Garcia *et al.*, 2007), sendo assim, a solução inicial é o tratamento endodôntico, mas com o avanço da lesão periapical, torna-se necessária uma complementação com uma apicectomia, que se não obtiver sucesso, partirá para uma exodontia do dente afetado. (Weber *et al.*, 2019; Caliskan *et al.*, 2016).

Em relação a etiopatogênese das lesões periapicais, sabe-se que a inflamação local é o principal mecanismo, a qual induz, dentre outros fatores, ativação osteoclástica e, assim, a reabsorção óssea é iniciada (NAIR, 2004; TAN *et al.*, 2018). Tem sido relatado que a inflamação inibe a diferenciação osteoblástica, através da via de sinalização WNT (TAN *et al.*, 2018) ou impactando negativamente a expressão de antagonistas dessa mesma via a exemplo do DKK-1 (BAUM e GRAVALLESE, 2014; TAN *et al.*, 2018), mas esse mecanismo de sinalização permanece pouco compreendido.

1.2 Via de Sinalização WNT

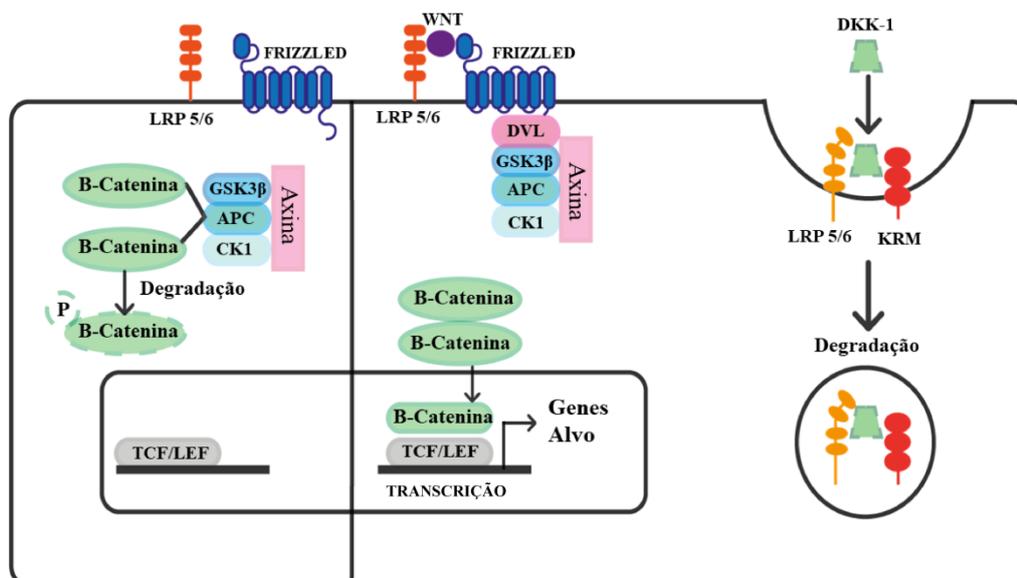
As proteínas WNT compreendem uma família de 19 glicoproteínas, que podem ser divididas em duas classes: classe WNT1 e classe WNT3. A classe WNT1 compreende Wnt1, Wnt2, Wnt5A, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt9a, Wnt9b e Wnt10b. A classe WNT3 inclui Wnt3 e Wnt3a (HUANG *et al.*, 2018; BAI, SHA e KANNO, 2020). Estas proteínas são essenciais para uma ampla variedade de processos fisiológicos como o desenvolvimento articular (WNT 4, 5 e 14) e a inibição da condrogênese (WNT7a) (GON *et al.*, 2013). Em processos patológicos, participam na angiogênese, regulação do crescimento celular da artrite reumatoide (WNT10b), sendo os seus mecanismo ainda não totalmente elucidados (SOUZA *et al.*, 2019), mieloma múltiplo (KOCEMBA *et al.*, 2012), câncer renal (HIRATA *et al.*, 2011) e colesteatoma do ouvido médio (LIN *et al.*, 2019).

Dentre as proteínas da classe WNT1, o Wnt10b é um regulador crucial da densidade óssea por sua capacidade de promover osteoblastogênese (HUANG *et al.*, 2018). Quando produzido por osteoclastos maduros, no início da reabsorção óssea, é um sinal para preparação dos progenitores de células mesenquimais indiferenciadas (COLLINS *et al.*, 2017).

As proteínas WNTs acionam várias cascatas de sinalização, sendo a mais conhecida a WNT/ β -Catenina, chamada de via canônica, que pode culminar na estabilização e a translocação nuclear de β -Catenina para ativação transcricional de genes (MONROE *et al.*, 2012). Além da via canônica, o WNT pode ativar outras vias, como a via de polaridade celular planar (PCP) e a via WNT/Ca₂₊, estas últimas duas consideradas as vias não canônicas (CHEN *et al.*, 2008; MIAO *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2018). As vias de sinalização WNT não canônicas estão associadas a processos que incluem migração neuronal, indução cardíaca, morfologia das células ciliadas cocleares, separação dos tecidos, padronização dorsoventral e câncer, onde transduz sinais que abrangem a via WNT/Ca₂₊, a via PCP, e a via JNK (HUANG *et al.*, 2018).

Dentre as proteínas WNT, o Wnt10b é um membro da família de ligantes WNT, que codificam a via de sinalização WNT/ β -Catenina. Foi descoberto em 1995 em glândulas mamárias de camundongos, sendo um regulador crucial da densidade óssea por sua capacidade de promover a osteoblastogênese (STEVENS *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2018). Entre as funções do Wnt10b estão a iniciação e regulação do tamanho dos dentes e desenvolvimento das raízes (KANTAPUTRA *et al.*, 2018), papel no sistema imunológico, sugerindo um mecanismo potencial no funcionamento e desenvolvimento das células T, uma sinergia comum entre LEF1 e TCF-1 é necessário para a diferenciação normal de células T como eles regulam processos celulares distintos e desenvolvimento de folículos e indução do ciclo capilar (WEND *et al.*, 2012), manutenção da densidade óssea e funções progenitoras mesenquimais (STEVENS *et al.*, 2010; WEND *et al.*, 2012).

Fig. 1 Vias de sinalização WNT



Fonte: (Adaptado de Reinhold *et al.*, 2019)

Como visualizado na figura 1, a sinalização funcional da via WNT/ β -Catenina inicia-se quando o ligante canônico WNT liga-se ao seu receptor de sete voltas, Frizzled (FZD), pertencente a receptores acoplados a proteína G, e com o receptor lipoproteico de baixa intensidade 5/6 (LRP) nas superfícies das células alvo, formando um complexo heterodimérico (CHEN *et al.*, 2008; MIAO *et al.*, 2013; ALBERS *et al.*, 2013). As cascatas de sinalização subsequentes envolvem ativação de proteínas intracelulares, como a proteína Dishelved (DSH), a Caseína Cinase 1 (CK1), Proteína da Adenomatose Poliposa de Cólon (APC), e Glicogênio Sintase Cinase 3 β (GSK3 β) (KOCEMBA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2019), onde a β -catenina é fosforilada por um complexo de destruição formado pelo GSK3 β , APC, Axina e CK1, e direcionada para a proteólise pelos proteassomas relacionados a ubiquitinação (CHEN *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2016; MIAO *et al.*, 2013; SHANG; HUA; HU, 2017; EJAZ, GHAFOR, 2019).

Após a ligação do fator de crescimento WNT ao seu receptor proteico membranar (FZD), a proteína DSH é ativada, sendo assim, se desassocia ao complexo de multiproteínas destruidor, levando a inativação da GSK3 β . Em seguida, a β -Catenina acumulada no citoplasma se transloca para o núcleo e interage com os fatores de transcrição do Fator de Células T/ Família de Fatores Potenciadores Linfóide (TCF/LEF) (CHEN *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2016; MIAO *et al.*, 2013; EJAZ, GHAFOR, 2019) e do recrutamento concomitante de co-ativadores como o *C-Myc* e

CyclinD-1, *Jun*, p300/CBP, *Pygopus* e *BCL9/Legless*, causando ativação transcricional de genes-alvo (SOUSA *et al.*, 2019; SHANG; HUA; HU, 2017).

As cascatas de sinalização mediadas pela interação WNT-FZD são complexas, sendo os sinais orquestrados intrinsecamente por vários reguladores extracelulares, citoplasmáticos e nucleares, como o DSH, GSK3 β , APC e outras moléculas funcionais. As consequências dessa sinalização incluem proliferação celular, adesão celular, migração celular, diferenciação celular e desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI-YANAGA, SASAGURI, 2009; FLAHERTY, KAMERZELL, 2012). A sinalização WNT/ β -catenina é conhecida por seus mecanismos fundamentais na determinação da polaridade da célula, proliferação e destino celular. Assim, a desregulação da sinalização WNT/ β -catenina é intimamente ligada a progressão na tumorigênese (CHEN *et al.*, 2018).

A β -catenina é geralmente encontrada em três locais distintos: nas junções celulares aderentes, onde interage diretamente com a E-caderina, no citoplasma e no núcleo (LIN *et al.*, 2019). Em um estágio inativado, os níveis de β -catenina são baixos no citoplasma, sendo fosforilada pelas proteínas APC, Axina, GSK3 β e CK1 (MIAO *et al.*, 2013). Quando ativada ela se transloca para o núcleo, regulando genes alvo responsáveis pela transcrição e proliferação celular como o *IF2 E ciclina D1* (LIN *et al.*, 2019; STEVENS *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2011; GATICA-ANDRADES *et al.*, 2017; HUMPHRIES; MLODZIK, 2017).

No tecido ósseo, a falta de translocação da β -Catenina para o núcleo prejudica a ativação de osteoblastos relacionados a genes da osteocalcina e osteoprotegerina, levando a uma osteoblastogênese reduzida e baixa massa óssea (LERNER, OHLSSON, 2015). A β -Catenina induz a expressão de OPG, em osteoblastos, influenciando por meio da sinalização canônica de WNT a reabsorção óssea mediada pela β -Catenina, nos osteoblastos (ALBERS *et al.*, 2013).

Entre os cinco antagonistas da sinalização WNT estão a proteína secretada relacionada ao FZD (sFRP), inibidores WNT fator 1 (Wif1), *Xenopus cerberus*, Wise e Dickkopf. A família Dickkopf consiste em quatro membros principais (DKK-1, DKK-2, DKK-3 e DKK-4) (HIRATA *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2018).

A Dickkopf-1 (DKK-1) é um tipo de proteína endógena secretada com dois domínios de cisteína que suprimem sinais da via de sinalização WNT/ β -Catenina e

inibem diferenciação osteoblástica e formação óssea, considerada a chave reguladora da remodelação óssea em condições fisiológicas e patológicas (HUANG *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019). A DKK-1 bloqueia sinalização WNT/ β -Catenina mediante a ligação com o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LRP), podendo estimular a osteoclastogênese e inibir a osteoblastogênese (GLINKA, *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2008; GOES *et al.*, 2019).

A proteína DKK-1 medeia os efeitos inibitórios na sinalização WNT de dois modos, podendo interferir em diversos processos por ligação aos receptores LRP5/LRP6, proteínas receptoras de baixa densidade (SOUZA *et al.*, 2019), bloqueando a interação com o complexo WNT-FZD, ou, a DKK1 liga-se ao LRP5/6 e a superfície co-receptora celular Kremen $\frac{1}{2}$, para a formação de um complexo ternário, que é internalizado, prevenindo a LRP de ligar-se a proteína WNT (INTINI; NYMAN, 2015). A deleção de um único alelo do gene DKK-1 em ratos, mostra formação aumentada e massa óssea na região medular devido a regulação positiva de sinalização canônica WNT (CHEN *et al.*, 2008; INTINI; NYMAN, 2015).

1.3 Via de sinalização WNT/ β -catenina no desenvolvimento de lesões odontogênicas

Na cavidade oral, a via WNT também tem sido estudada em diversas lesões e alterações de padrão de normalidade, como anomalias dentárias (KANTAPUTRA *et al.*, 2018) e tumores odontogênicos (HAKIM *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019).

Hakim *et al.* (2010) analisaram comparativamente as proteínas wnt1, wnt10a, β -catenina, E-caderina, p63, p53, ki67 e ciclina D1 em tumores odontogênicos ceratocísticos síndrômicos e não síndrômicos, cistos dentígeros (CD). Foi realizada uma avaliação morfológica para determinar a maior localização das proteínas nas lesões em questão. Houve imunomarcagem de β -catenina no epitélio dos CD, em todas as suas camadas e uma menor coloração nos ceratocistos não-síndrômicos. E-caderina foi marcada em toda a superfície da membrana epitelial dos CD, em contraste com a perda nos não-síndrômicos. Em adição aos resultados das proteínas de p53, p63 e ciclina D1 postula-se a estreita relação entre o aumento da expressão da proteína ciclina D1 do ciclo celular e invasão celular característica dessas lesões.

Guimarães *et al.* (2015) realizaram uma análise imunoistoquímica comparativa em seu estudo das expressões de Wnt5a, MMP2, 7 e 20 em oitenta e um espécimes de tumores odontogênicos, incluindo entre eles ameloblastomas, tumor odontogênico ceratocístico e trinta e dois cistos odontogênicos. A expressão de Wnt5a em tumores odontogênicos e cistos inflamatórios apresentou-se maior que em cistos odontogênicos de desenvolvimento, porém, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado aos tumores analisados. Concluiu-se que a expressão de Wnt5a no grupo de lesões odontogênicas sugerem sua participação na progressão e manutenção dessas lesões, sendo possivelmente envolvidas nas diferenças biológicas entre tumores e cistos odontogênicos.

Dutra *et al.* (2017) analisaram comparativamente a imunoexpressão de Wnt1, Wnt5A e β -Catenina em um grupo de 17 ameloblastomas (AME) e 6 tumores odontogênicos císticos calcificantes (TOCC). O Wnt1 e Wnt5A foram detectados heterogeneamente no epitélio de todos os TOCC. A β -Catenina demonstrou imunomarcagem para 14 casos de AME e todos os casos de TOCC. A superexpressão de Wnt1 no AME sugere que ele é um potente ativador da via canônica, e como consequência dessa ativação, há uma alta expressão de β -Catenina citoplasmática, reforçando a possível relação entre a via de sinalização WNT/ β -Catenina e o processo de tumorigênese do AME e do TOCC.

Kantaputra *et al.* (2018) avaliaram uma possível associação de anomalias dentárias com mutação do gene Wnt10b em uma coorte de 256 famílias, onde foi realizado o sequenciamento total do exoma, e exames radiográficos (periapicais e panorâmica). Foram relatadas duas variantes heterozigotas em pacientes com anomalias dentárias isoladas, onde um fenótipo grave foi relatado na combinação de Wnt10A e Wnt10b, confirmando a associação entre mutações em Wnt10b e anomalias dentárias como agenesia dentária isolada, hipodontia de leve a grave, microdontia, raízes dentárias curtas, taurodontismo e microdontia de incisivos permanentes. A sinalização WNT/ β -Catenina pode levar a interações anormais da bainha epitelial de Hertwig, explicando assim a formação de raízes curtas e o taurodontismo. A associação da mutação de Wnt10b com a anomalia dentária, revela que ela desempenha papel importante na iniciação, regulação do tamanho dos dentes e desenvolvimento das raízes.

Souza *et al.* (2019) avaliaram a participação das vias canônicas de sinalização WNT e NF- κ B, em modelo experimental de artrite crônica na articulação

temporomandibular (ATM) de ratos *Winstar*. A análise imunoistoquímica, para o TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, RANKL, Wnt10b, β -Catenina e DKK-1, revelou aumento na imunomarcção de TNF- α e IL-1 β nas amostras em que a artrite foi induzida. O Wnt10b obteve aumento de marcação em ratos artríticos, sugerindo uma ativação específica da via WNT na ATM desses ratos. A diminuição da expressão de Wnt10b e β -Catenina em fibroblastos, células endoteliais e sinoviais, sugere um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). Em contrapartida, um aumento de DKK-1 propiciou uma diminuição desses dois biomarcadores, como um feedback negativo para o Wnt10b através do complexo de transcrição da β -Catenina/TCF. Dessa forma, os resultados sugerem a participação da via WNT na via de sinalização NF- κ B durante o desenvolvimento da artrite reumatoide.

Santos *et al.* (2019) analisaram e compararam as imunoexpressões de Regg, Wnt1 e β -catenina em ameloblastomas, tumores odontogênicos adenomatóides (TOAs) e ceratocistos odontogênicos (CO), sendo analisados semiquantitativamente nos seus componentes epiteliais e em suas diferentes composições celulares. A expressão da membrana de β -catenina foi maior em CO em comparação com ameloblastomas e TOAs e a expressão nuclear de β -catenina foi maior em ameloblastomas e TOAs em comparação aos CO. Em suma, os resultados sugerem que essas proteínas participem da patogenia dessas lesões. As maiores expressões de Regg, Wnt1 e β -catenina nuclear em ameloblastomas podem estar relacionadas a um comportamento mais agressivo, porém, esse comportamento pode ser contrabalanceado por vias inibitórias em TOAs, justificando assim, sua baixa agressividade.

1.4 Via de sinalização Wnt/ β -catenina e seu inibidor DKK-1 no desenvolvimento de lesões periapicais

No tocante a avaliação do papel da via Wnt/ β -catenina e seu inibidor DKK-1 em lesões periapicais, são encontradas na literatura, alguns estudos que tentam elucidar o papel da via por diferentes metodologias.

Zhang *et al.* (2014) avaliaram a expressão do DKK-1 e RANKL em lesões periapicais, induzidas em maxilares de ratos *Wistar*. Através de histoquímica, imunoistoquímica e imunofluorescência, observaram uma expansão das lesões periapicais no decorrer de 21 dias e também mostraram correlação positiva da expressão

do DKK-1 com RANKL e com quantidade de osteoclastos (células multinucleadas positivas para TRAP). No período de 7 a 28 dias, evidenciando, que o DKK-1 é regulado, via RANKL, no desenvolvimento das lesões periapicais, estando associado com a resposta inflamatória e a reabsorção óssea nessas lesões.

Tang *et al.* (2014) investigaram o envolvimento da sinalização Wnt/ β -catenina em destruição óssea periapical em células mesenquimais de medula óssea de ratos (BMMSCs) e se o Cloreto de Lítio (CLi) era capaz de promover a restauração óssea. As BMMSCs foram isoladas e cultivadas em meio osteogênico e coadministrada a Wnt3a durante o período de 28 dias, onde realizaram-se testes de atividade de fosfatase alcalina, Western blot, ensaio de mineralização, ensaio de luciferase, a lesão periapical experimental em ratos e o regime da dosagem de lítio, medição por meio de Micro-CT, análise histológica e imunistoquímica. O tratamento com Wnt3a reverteu a redução da transcrição do complexo transcricional β -catenina/TCF-LEF. O Lipopolissacarídeo atenuou a diferenciação osteogênica da BMMSCs por inibir a sinalização Wnt/ β -catenina, enquanto que o tratamento com CLi resgata essa diferenciação osteogênica estressada por inflamação *in vivo*. Wnt3a demonstrou ser um regulador potente de diferenciação osteogênica. Os resultados indicaram que a utilização de CLi desempenha papel díspares e atua de formas diferentes durante as diferentes fases do reparo da lesão óssea. Em resumo, os resultados demonstram que a promoção de osteoblastogênese via modulação de sinalização Wnt/ β -catenina pode ser uma alternativa viável para acelerar a cura de perda óssea alveolar.

Tan *et al.* (2018) avaliaram o envolvimento da via de sinalização WNT/ β -catenina-DKK-1 na atenuação da diferenciação osteogênica e verificar o uso do inibidor de DKK-1 e a DKK-1 recombinante em diferentes fases da diferenciação osteogênica em ratos *Wistar*. A avaliação foi realizada por meio de PCR em tempo real, *Western Blot* e ensaio de atividade de fosfatase alcalina. O uso da proteína recombinante DKK-1 *in vitro* reverteu parcialmente a diminuição na expressão do marcador osteogênico e o modelo de rato indicou que o inibidor de DKK-1 poderia restaurar a perda óssea na área periapical *in vivo*. Foi sugerido, portanto, que o DKK-1 pode desempenhar um papel regulador na determinação do resultado ósseo em ambientes inflamatórios e a modulação da via de sinalização WNT/ β -catenina por meio de inibidor da DKK-1 pode ser uma opção terapêutica potencial para evitar a destruição óssea.

De Sousa *et al.* (2019), em um estudo multicêntrico com 188 voluntários que tinham periodontite apical (PA) e 230 que compunham o grupo controle observaram a associação de Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *wnt3*, *wnt3a*, *wnt5a*, *wnt8a*, *wnt9b* e *wnt11*, onde podem contribuir para o risco de PA e avaliaram a função de SNPs associados e análise de expressão de mRNA de genes WNT em tecidos com PA com testes de genotipagem, ensaio de repórter luciferase e ensaio de expressão gênica. A expressão de *wnt3*, *wnt3a* e *wnt5a* foram significativamente maiores em lesões PA do que no grupo controle. O *wnt5a* é regulado positivamente em doenças inflamatórias sistêmicas como a artrite reumatoide e também em tecidos com PA, em que os níveis da expressão de *Wnt5a* aumentaram com a gravidade da inflamação. Os resultados sugerem que os genes WNT tem um papel importante na modulação da periodontite apical e polimorfismos nestes genes podem aumentar a susceptibilidade a PA.

Yang *et al.* (2021) tinham por objetivo explorar o mecanismo da secreção da proteína I do Frizzled (sFRP1) nas células de diferenciação gênica do ligamento periodontal humano sob condições inflamatórias, onde essas culturas foram cultivadas estimulando a *Porphyromonas gingivalis* lipopolissacarídeo com ou sem a inibição de sFRP1. Foram realizados os testes de polivalência quantitativa em tempo real de reação em cadeia da merase, Western Blot e ensaio de enzima de imunoadsorção para avaliar a expressão de marcadores osteogênicos e a via de sinalização WNT clássica. Testes de isolamento e cultura de células, indução osteogênica e tratamento com *P. gingivalis* LPS, experimentos de inibição, reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, indução de periodontite em ratos Wistar, análise tridimensional de micro-CT, coloração hematoxilina-eosina e imunistoquímica. O *P. gingivalis* LPS inibiu a expressão de mRNA de osteoblastos específicos durante a indução osteogênica, como *Runx2*. Esses resultados sugerem que o LPS diminuiu a capacidade da diferenciação osteogênica das HPDLCs. Os resultados demonstraram conclusivamente que *P. gingivalis* LPS estimulou a expressão de sFRP1, e assim levou à supressão da sinalização WNT, o que pode promover a degradação de β -catenina e, em última análise, suprime a diferença osteogênica de HPDLCs. Sob condições tratadas com LPS, o sFRP1 pode suprimir a diferenciação osteogênica como um sinal de desacoplamento em HPDLCs através do sinal WNT. Além disso, a inibição de sFRP1 poderia atenuar a perda óssea in vivo.

Naruse *et al.* (2021) identificaram em seu estudo, genes relacionados a doenças analisando os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) usando DNA genômico isolado de pacientes com PA. Modelos de ratos foram utilizados para testar o papel da via de sinalização Wnt/ β -catenina no desenvolvimento e cura da PA. Foram realizados a coloração por hematoxilina-eosina, hibridização *in situ* para os marcadores *Axin2*, *Coll1*, *Runx2*, entre outros e imunistoquímica para CD3+ e CD45R. A ativação da via de sinalização pela administração de IWR-1 suprimiu a diferenciação de osteoblastos e, a seguir, promoveu o aumento do volume da lesão periapical. Os achados sugerem que a via regule o desenvolvimento da lesão periapical por meio da regulação positiva da capacidade de proliferação de células B, isto é consistente com o resultado do aumento do número de células B na lesão periapical com o grupo de CILi.

Portanto, baseado nesse contexto, e na escassez de trabalhos que avaliem a participação da via WNT/ β -catenina e seu inibidor, o DKK-1, na patogênese das lesões periapicais, esta pesquisa objetiva avaliar, através da imunistoquímica, a expressão do Wnt10b e β -catenina, em uma série de casos de GP, CR e CRR, comparando-a com características morfológicas. Espera-se assim, contribuir para um melhor entendimento sobre a patogênese destas lesões.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliou, por meio de imunistoquímica, a expressão de Wnt10b e β -catenina em GP, CR e CRR.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliou, morfológicamente, os casos de GPs, CRs, CRRs quanto a intensidade do infiltrado inflamatório (grau I, II e III) presente no tecido conjuntivo/cápsula, e o padrão de revestimento epitelial (atrófico/ hiperplásico) das lesões císticas.
- Analisou a imunexpressão de Wnt10b e β -catenina em GP, CR e CRR, especificando o compartimento celular de sua expressão (núcleo, citoplasma, membrana).
- Corelacionou a imunexpressão de Wnt10b e β -catenina com a intensidade do infiltrado inflamatório (graus I, II e III).
- Corelacionou as imunexpressões de Wnt10b e β -catenina com o padrão de revestimento epitelial dos CRs e CRR.
- Avaliou possíveis correlações entre as imunexpressões de Wnt10b e β -catenina em cada grupo de lesão.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetido à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Recebeu sua aprovação sob o número CAAE 35613220.3.0000.5187 e número do parecer 4.197.082 (ANEXO A).

4.2 Caracterização do estudo

O estudo constituiu em uma pesquisa observacional, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunoexpressões das proteínas Wnt10b e β -catenina em GP, CR e CRR.

4.3 População

A população do estudo foi constituída por todos os casos de GP, CR e CRR diagnosticados e arquivados nos Laboratórios de Histopatologia Oral dos Departamentos de Odontologia da UEPB– Campus I – Campina Grande, da Universidade Federal de Pernambuco – Campus Recife e da Universidade de Fortaleza – Campus Fortaleza, no período de 2011 a 2020.

4.4 Amostra

A amostra foi constituída por 20 casos de GP, vinte casos de CR e 20 casos de CRR, todos emblocados em parafina. Os casos foram selecionados nos arquivos dos serviços relacionados anteriormente, a partir da técnica de amostragem do tipo não probabilística, por conveniência.

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas casos de GPs, CRs e CRRs que apresentassem quantidade suficiente de material biológico parafinado para realização das análises morfológicas e imunoistoquímicas. Para os GPs, foram selecionados apenas os casos em que se apresentavam ausentes de qualquer remanescente de epitélio odontogênico disperso no tecido conjuntivo constituinte da lesão. Para CRs e CRRs, foram incluídos somente os espécimes que exibiam uma cavidade patológica revestida, total ou parcialmente, por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado.

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os casos de GPs e CRs relacionados a dentes com tratamento endodôntico prévio, tendo em vista a possibilidade da mudança de microbiota associada ao tratamento intrarradicular, e, por conseguinte, o perfil do infiltrado inflamatório nessas lesões.

4.5 Variáveis

As variáveis independentes e dependentes que foram analisadas no presente estudo estão listadas nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1. Elenco de variáveis independentes que foram analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Sexo	Sexo do paciente	- Feminino - Masculino
Idade	Idade do paciente	Em anos
Tipo de lesão	Lesões periapicais crônicas de origem inflamatória	- Granuloma Periapical - Cisto Radicular - Cisto Radicular Residual
Infiltrado Inflamatório	Intensidade da extensão das 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

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Quadro 2. Elenco de variáveis dependentes que foram analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Imunoexpressão de Wnt10b	Percentual das células positivas	- Citoplasmática - Membranar - Nuclear
Imunoexpressão de β -Catenina	Percentual das células positivas	- Citoplasmática - Membranar - Nuclear.

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.6 Estudo clínico

Informações sobre o sexo e a idade dos pacientes foram coletadas das fichas de requisição de biópsia (APÊNDICE A) e, posteriormente, utilizadas para caracterização da amostra.

4.7 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, 200x e 400x, com cortes de 5 µm de espessura e corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). A intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como o padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas foram os aspectos histopatológicos analisados. Uma examinadora previamente treinada realizou a análise histomorfológica e os dados foram transcritos para uma ficha elaborada para o estudo (APÊNDICE A).

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com os critérios de Peixoto *et al.* (2012). A partir da porção central dos GP 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 apresentaram restrito a um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I; as lesões com células inflamatórias presentes em dois terços foram definidas como de grau II; e as lesões que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços foram categorizadas como de grau III.

Para os CRs e CRRs, o padrão de revestimento epitelial foi avaliado segundo a metodologia de Moreira *et al.* (2000). Com base no padrão predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os cistos que apresentassem em sua maior extensão o revestimento epitelial constituído de 2 a 10 camadas de células de espessura, e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial plano. 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 arciformes entre a cápsula e o revestimento epitelial.

4.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

4.8.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3 μ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*EnVision™ Flex+*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando o anticorpo primário monoclonal anti- β -Catenina e os policlonal anti-Wnt10b (QUADRO 3).

Quadro 3. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários que foram utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Wnt10b	PAP553H u01	Cloud- Clone Corp.	1:4000	Tris-EDTA, pH 9.0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60min	<i>Overnight</i>
β -Catenina	β - catenina-1	DAKO	<i>Ready- to-use</i>	Tris-EDTA, pH 9.0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60min	<i>Overnight</i>

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Cortes histológicos de tonsilas humanas normais foram empregados como controle positivo. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário no protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB, descrito a seguir:

⇒Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (20 minutos cada);

⇒Reidratação em cadeia descendente de etanóis:

- Álcool etílico absoluto I (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 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 TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*EnVision Flex antibody diluente*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (QUADRO 6);
- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário conjugado com polímero de dextrano (*EnVision™ Flex/HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*EnVision™ Flex DAB+*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Harry, à temperatura ambiente (3 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina *Entellan® new*, (Merck KGaA, Darmstadt, DE).

4.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), avaliado por uma examinadora previamente calibrada e os dados anotados em fichas elaboradas previamente para o estudo (APÊNDICE B). Para as análises imunoistoquímicas, foi realizado o mascaramento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos.

Para a análise da imunoexpressão de Wnt10b e β -catenina, foi adaptada a metodologia utilizada no estudo de Brito *et al.* (2018). Dessa forma foram consideradas positivas todas as células inflamatórias e células endoteliais, no conjuntivo, e células epiteliais que apresentassem coloração acastanhada na membrana plasmática, citoplasma e/ou núcleo, independente da intensidade.

A imunoexpressão foi avaliada quantitativamente, sendo estabelecida, mediante a análise de 5 campos microscópicos com maior imunoexpressão para cada componente

avaliado (epitelial e conjuntivo) para todas as lesões. Em um aumento de 200x foram identificados os campos com maior imunorreatividade, e após a identificação dessas áreas, elas foram fotomicrografadas no aumento de 400x.

Cada uma destas áreas fotomicrografadas (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) foram transferidas para um computador. A imunexpressão dos marcadores Wnt10b e β -catenina foi analisada com o auxílio do programa *Image J* (*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 microscópico, onde foi estabelecido o percentual de células positivas em relação ao número total de células contadas.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (Versão 20.0, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para β -catenina e Wnt10b foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal.

Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para β -catenina e Wnt10b, de acordo com os grupos de lesões e suas características histopatológicas. Possíveis correlações entre as imunexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. Em virtude do pequeno número de casos de CRR com imunopositividade nuclear para β -catenina no revestimento epitelial, os dados obtidos com essa análise foram submetidos apenas à estatística descritiva. Para todos os testes estatísticos utilizados neste estudo, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 ARTIGO

5.1 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 desse projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação, o qual será intitulado **“Imunoexpressão dos marcadores da via de sinalização WNT (Wnt10b e β -catenina) em granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos residuais.”**

O referido artigo será submetido ao periódico *Jornal of Endodontics* (ISSN: 1878-3554, Fator de impacto: 4.171, Qualis A1), cujas normas para submissão de trabalhos estão apresentadas no Anexo B. Após as considerações da banca, o artigo será traduzido para a língua inglesa.

5.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT (Wnt10b e β -CATENINA) EM GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS RESIDUAIS

Catarina Pereira Monteiro Lima, DDS, MSC^a; Allany de Oliveira Andrade, DDS, MSC^a; Gustavo Pina Godoy, DDS, PhD^b; Cassiano Francisco Weege Nonaka, DDS, PhD^a; Pollianna Alves Muniz, DDS, PhD^a.

^a Programa de pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.

^b Programa de pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente:

Pollianna Muniz Alves

Programa de Pós-graduação em Odontologia – Universidade Estadual da Paraíba
Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, PB, CEP 58429-500.

5.2.1 RESUMO

Introdução: A via de sinalização WNT/ β -Catenina está envolvida em diversos processos fisiopatológicos, no entanto, sua participação na reabsorção óssea decorrente das lesões periapicais permanece sem ser completamente elucidada. Avaliou as imunoexpressões do Wnt10b e β -catenina em granulomas periapicais (GP), cistos radiculares (CR) e cistos radiculares residuais (CRR), correlacionando-as com o padrão de revestimento epitelial e o grau de infiltrado inflamatório. 60 espécimes (20 GP, 20 CR e 20 CRR) foram selecionados para realização de análise morfológica. A análise imunoistoquímica com os anticorpos anti β -Catenina e anti-Wnt10b foi avaliada em epitélio e tecido conjuntivo, de forma quantitativa. Para a análise estatística, utilizaram-se os testes de Mann-Whitney e Correlação de Spearman, ($p < 0,05$). **Resultados:** Em relação à β -catenina no tecido conjuntivo, observou-se imunoexpressão citoplasmática em todos os casos de GP, CR e CRR, e com expressão significativamente maior em CR, tanto em citoplasma quanto em núcleo ($p < 0,05$). No revestimento epitelial, evidenciou-se predomínio de imunoexpressão membranar e citoplasmática na maioria dos CR e CRR ($p < 0,05$). Houve também associação significativa da imunoexpressão citoplasmática da β -catenina nas lesões com infiltrado inflamatório grau III ($p < 0,05$). Em relação ao Wnt10b no tecido conjuntivo, observou-se predomínio de imunoexpressão citoplasmática e nuclear nos casos de GP, CR e CRR. Houve associação significativa da imunoexpressão citoplasmática do Wnt10b com lesões de infiltrado inflamatório grau III ($p < 0,05$) e imunoexpressão membranar com cistos de epitélio hiperplásico ($p < 0,05$). **Conclusão:** Evidenciou-se participação da via de sinalização Wnt10b/ β -catenina na patogênese das lesões periapicais, sugerindo um possível papel pró-inflamatório.

Palavras-chave: Imunoistoquímica, Granuloma Periapical, Cisto Radicular, Cistos Odontogênicos, Via de sinalização WNT.

5.2.2 Introdução

Lesões periapicais correspondem a uma reação inflamatória ao redor do ápice dental, causadas por uma infecção bacteriana do sistema de canais radiculares. É resultado de uma complexa interação de comunicação celular, necessária para a regulação funcional e integração das células do sistema imunológico com os microrganismos envolvidos na infecção radicular (1-4) As bactérias e seus produtos tóxicos, que estão dentro dos canais radiculares, progridem através do forame apical levando a uma inflamação do tecido conjuntivo periapical, sob a forma de um abscesso ou lesão aguda (1,5,6). Uma vez que haja continuação do estímulo, a lesão pode evoluir dando origem a uma das suas formas crônicas, que correspondem ao Granuloma Periapical (GP) e Cisto Radicular (CR) (4,7). O Cisto Radicular Residual (CRR)

corresponde ao CR que permanece nos ossos gnáticos, após remoção do dente associado (3,7, 8).

A inflamação é considerada o principal mecanismo etiopatogênico, que induz ativação osteoclástica e também, a reabsorção óssea (1,9). Há relatos de que a sinalização WNT inibe a diferenciação osteoblástica através da inflamação (9) ou impacta negativamente a expressão de antagonistas desta via, permanecendo ainda, um mecanismo pouco compreendido.

As proteínas WNT constituem uma grande família de ligantes secretados, ricos em cisteínas, que são essenciais para uma ampla variedade de processos fisiológicos como o desenvolvimento articular (Wnt 4, 5 e 14) e a inibição da condrogênese (Wnt7a) (11), e patológicos como o aumento da angiogênese e regulação do crescimento celular na artrite reumatoide (Wnt10b) (12), mieloma múltiplo (13) e colesteatoma do ouvido médio (14). As WNTs acionam várias cascatas de sinalização, sendo a mais conhecida a WNT/ β -catenina, chamada de via canônica, que pode culminar na estabilização e a translocação nuclear de β -catenina para ativação transcricional dos diversos genes (15).

Dentre as proteínas WNT, o Wnt10b é um membro da família de ligantes WNT, que participam da via de sinalização WNT/ β -catenina. Foi descoberto pela primeira vez em 1995 em glândulas mamárias de camundongos, sendo reguladores cruciais da densidade óssea por sua capacidade de promover a osteoblastogênese (16,17). Entre as funções do Wnt10b estão a iniciação e regulação do tamanho dos dentes e desenvolvimento das raízes (18), papel no sistema imunológico, mecanismo potencial no funcionamento e desenvolvimento das células T, desenvolvimento de folículos e indução do ciclo capilar (19), manutenção da densidade óssea e funções progenitoras mesenquimais (16,19).

Avaliação do papel da via Wnt/ β -catenina em lesões periapicais ainda é pouco investigada. Tan *et al.* (9) avaliaram a participação da via de sinalização Wnt/ β -catenina e DKK-1 na atenuação da diferenciação osteogênica e verificaram o uso do inibidor de DKK-1 em diferentes fases da diferenciação osteogênica em ratos. A inflamação inibiu a diferenciação osteoblástica, através da via de sinalização Wnt/ β -catenina ou impactou negativamente a expressão de antagonistas dessa mesma via como o DKK-1.

Portanto, baseado nesse contexto, e na escassez de trabalhos que avaliem a participação da via WNT/ β -catenina na patogênese das lesões periapicais, esta pesquisa

objetiva avaliar, através da imunohistoquímica, a expressão do Wnt10b e β -catenina em uma série de casos de GP, CR e CRR, comparando-a com características morfológicas. Espera-se assim, contribuir para um melhor entendimento sobre a patogênese destas lesões.

5.2.3 Materiais e métodos

Seleção da amostra

Amostras de tecido de 60 espécimes (20 GPs, 20 CRs e 20 CRRs) armazenados nos arquivos do Laboratório de Histopatologia Oral, Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil, foram selecionados. Apenas GPs sem epitélio odontogênico foram selecionados para o estudo. Todos os CRs e CRRs apresentaram cavidade cística revestida por epitélio escamoso estratificado não queratinizado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual da Paraíba (aprovação no. 35613220.3.0000.5187).

Foram incluídos na amostra, apenas casos de GPs, CRs e CRRs que apresentassem quantidade suficiente de material biológico parafinado para realização das análises morfológicas e imunohistoquímicas. Para os GPs, foram selecionados apenas os casos em que se apresentavam ausentes de qualquer remanescente de epitélio odontogênico disperso no tecido conjuntivo constituinte da lesão. Para CRs e CRRs, foram incluídos somente os espécimes que exibiam uma cavidade patológica revestida, total ou parcialmente, por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado. Foram excluídos da pesquisa os casos de GPs e CRs relacionados a dentes com tratamento endodôntico prévio, tendo em vista a possibilidade da mudança de microbiota associada ao tratamento intrarradicular, e, por conseguinte, o perfil do infiltrado inflamatório nessas lesões.

Análise morfológica

Para o estudo morfológico, cortes de 5 μ m de espessura foram corados em hematoxilina-eosina, e 2 patologistas orais analisaram as seções sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE). A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada a partir do centro dos GPs e da porção luminal das lesões císticas em direção à periferia. O campo foi examinado no microscópio com ampliação de 200x. Amostras cujo infiltrado inflamatório estava restrito a um terço do

campo microscópico foram classificadas como grau I, lesões com células inflamatórias até dois terços como grau II e lesões com infiltrado inflamatório superior a dois terços como grau III (20). O padrão de revestimento epitelial foi determinado com base no tipo predominante de cada caso. Cistos com epitélio predominantemente revestidos por epitélio com 2 a 10 camadas de células foram considerados atróficos. Cistos com revestimento apresentando mais de 10 camadas de células, foram classificadas como hiperplásicas (21).

Análise imunoistoquímica

Cortes de três micrômetros de espessura foram montados em lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram desparafinizados, submetidos à recuperação antigênica e imersos em peróxido de hidrogênio para bloquear a peroxidase endógena. Os cortes foram lavados com solução tampão de Tween e incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti- β -catenina (Clone β -catenina, Dako, ready-to-use, Tris-EDTA com pH 9.0, overnight) e anticorpo primário policlonal anti-Wnt10b (Clone PAP553Hu01, Cloud-Clone Corp, 1:4000, Tris-EDTA com pH 9.0, overnight) em uma câmara úmida. Os cortes foram lavados duas vezes com solução tampão de Tween e colocados em temperatura ambiente com polímero à base de dextrano (*EnVision™ Flex+*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada pela imersão dos cortes em diaminobenzidina (*EnVision™ Flex + substrate system*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), que resulta em uma marcação acastanhada. Os cortes sofreram contracorados em Hematoxilina de Harris e cobertos com uma lamínula de vidro. Cortes histológicos de tonsilas humanas normais foram empregados como controle positivo. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário

Avaliação imunoistoquímica e análise estatística

Sob microscopia de luz (Leica DM 500), uma observadora previamente treinada identificou 10 campos com ampliação de 200x com maior impositividade, sendo 5 campos de revestimento epitelial e 5 de tecido conjuntivo. Fotomicrografias das áreas escolhidas foram obtidas com ampliação de 400x (ICC 50 HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens transferidas para o programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java; National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). O número de células positivas foi determinada em relação ao número total de células contadas (22).

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o

auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (Versão 20.0, IBM SPPS Inc., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para β -catenina e Wnt10b foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para β -catenina e Wnt10b, de acordo com os grupos de lesões e suas características histopatológicas. Possíveis correlações entre as imunoexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. Em virtude do pequeno número de casos de CRR com imunopositividade nuclear para β -catenina no revestimento epitelial, os dados obtidos com essa análise foram submetidos apenas à estatística descritiva. Para todos os testes estatísticos utilizados foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5.2.4 Resultados

Análise clínica e morfológica

Os GPs avaliados estavam localizados, predominantemente, na região de mandíbula (n=12; 60,0%), com idade média de 42 anos (desvio padrão $\pm 18,0$) acometendo igualmente o sexo feminino e masculino (50%). Os CRs foram localizados, em sua maioria, em maxila (n=12; 60,0%), acometendo os pacientes com idade média de 33,6 anos (desvio padrão $\pm 16,6$), sendo mais predominante no sexo masculino (n=14; 70,0%). Já os CRRs estavam presentes, em sua maioria, em região de maxila (n=13; 65%) com idade média de 48,6 anos (desvio padrão $\pm 13,6$), acometendo mais o sexo feminino (n=12, 60%), conforme os dados da tabela 1.

O infiltrado inflamatório dos GPs revelou 18 casos grau III (90,0%) e 2 casos grau II (10,0%). Em casos de CR foram evidenciados 12 casos (60,0%) grau III, 5 casos grau II (25,0%) e 3 casos grau I (15,0%). Já os CRR apresentavam 12 casos grau II (60,0%), 5 casos grau III (25,0%) e 3 casos grau I (15,0%). A análise do revestimento epitelial dos CR revelou que 13 casos (65,0%) apresentavam padrão de revestimento epitelial hiperplásico e 7 casos (35,0%) com padrão atrófico. Já nos CRR houve uma predominância de 13 casos (65,0%) do padrão de revestimento epitelial atrófico e 7 (35,0%) casos de padrão hiperplásico.

Tabela 1. Distribuição dos casos de GP, CR e CRR de acordo com as características clinicopatológicas.

Dados clinicopatológico	GP	CR	CRR
<i>Idade (em anos)</i>			
Variação	10 – 76	6 – 75	22 – 75
Média ± desvio padrão	42,0 ± 18,0	33,6 ± 16,6	48,6 ± 13,6
<i>Sexo</i>			
Feminino	10 (50,0%)	14 (70,0%)	12 (60,0%)
Masculino	10 (50,0%)	6 (30,0%)	8 (40,0%)
<i>Localização anatômica</i>			
Maxila	8 (40,0%)	12 (60,0%)	13 (65,0%)
Mandíbula	12 (60,0%)	8 (40,0%)	7 (35,0%)
<i>Intensidade do infiltrado inflamatório</i>			
Grau I	0 (0,0%)	3 (15,0%)	3 (15,0%)
Grau II	2 (10,0%)	5 (25,0%)	12 (60,0%)
Grau III	18 (90,0%)	12 (60,0%)	5 (25,0%)
<i>Padrão do revestimento epitelial</i>			
Atrófico	NA	7 (35,0%)	13 (65,0%)
Hiperplásico	NA	13 (65,0%)	7 (35,0%)

Legenda: NA – Não se aplica.

Análise imunoistoquímica

Imunoexpressão da β -catenina

No tecido conjuntivo, foi constatada imunoexpressão citoplasmática de β -catenina em todos os casos de GP, CR e CRR avaliados, com positividade em células inflamatórias e células endoteliais (Fig. 2A-C). Positividade nuclear para essa proteína, por sua vez, foi observada em todos os casos de GP e CR, bem como na maioria dos CRRs (n = 18; 90,0%) (Tabela 2, Fig. 2A, 2). A análise dos percentuais de imunopositividade para β -catenina revelou expressão significativamente superior nos CRs quando comparados aos GPs e CRRs, tanto em citoplasma quanto em núcleo ($p < 0,05$) (Tabela 2) (Fig. 2B). (Fig. 3A, 2). Não foram constatadas diferenças nos percentuais de positividade para β -catenina em tecido conjuntivo entre GPs e CRRs ($p > 0,05$) (Tabela 2) (Fig. 3A, 2).

No revestimento epitelial, foi observada imunoexpressão membranar de β -catenina na maioria dos CRs (n = 18; 90,0%) e CRRs (n = 18; 90,0%) analisados. De forma similar, a maioria dos CRs (n = 19; 95,0%) e CRRs (n = 19; 95,0%) apresentaram imunorreatividade citoplasmática para essa proteína (Fig. 2B, B). Imunoexpressão nuclear de β -catenina, por sua vez, foi identificada em uma pequena proporção de casos de CR (n = 7; 35,0%) e CRR (n = 2; 10,0%). Comparados aos CRRs, os CRs

apresentaram maiores percentuais de imunopositividade para β -catenina, tanto em membrana quanto em citoplasma ($p < 0,05$) (Tabela 3) (Fig. 3B, 2).

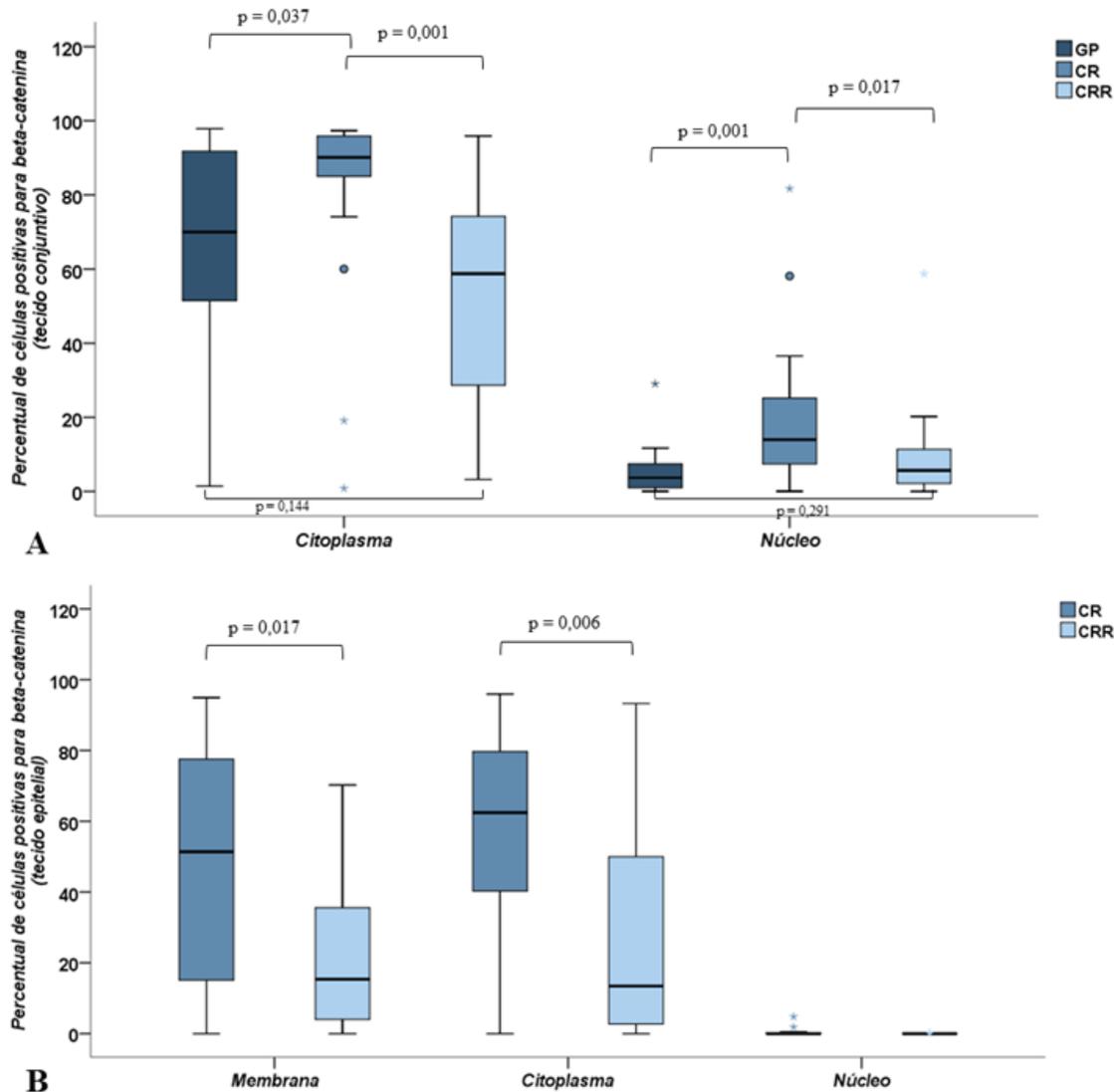


Figura 3. Gráficos de box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para β -catenina na cápsula (A) e no revestimento epitelial (B) dos GP, CR e CRR.

Em relação aos aspectos histopatológicos das lesões (intensidade do infiltrado inflamatório e padrão do revestimento epitelial), foram identificadas diferenças estatisticamente significativas apenas para os percentuais de imunoposição citoplasmática de β -catenina no tecido conjuntivo (Tabelas 2 e 3). Nesse sentido, lesões com infiltrado inflamatório grau III apresentaram maiores percentuais de positividade quando comparadas a lesões com infiltrado inflamatório grau I/II ($p < 0,05$) (Fig. 5A, 5).

Imunoexpressão de Wnt10b

No tecido conjuntivo, observou-se imunoexpressão citoplasmática de Wnt10b em todos os casos de GP e CR, bem como na maioria dos CRRs (n = 19; 95,0%) avaliados no presente estudo (Fig. 2D-F). Em relação à imunoexpressão nuclear dessa proteína, foi constatada positividade em todos os CRs e na maioria dos GPs (n = 19; 95,0%) e CRRs (n = 18; 90,0%). A análise dos percentuais de imunopositividade para Wnt10b revelou expressão significativamente inferior nos CRRs quando comparados aos GPs e CRs, tanto em citoplasma quanto em núcleo ($p < 0,001$) (Tabela 2) (Fig. 2F) (Fig. 4A). Não foram constatadas diferenças nos percentuais de positividade para Wnt10b em tecido conjuntivo entre GPs e CRs ($p > 0,05$) (Tabela 02) (Fig. 4A).

No revestimento epitelial, foi observada imunoexpressão membranar de Wnt10b em 11 (55,0%) casos de CR e 5 (25,0%) casos de CRR analisados. Expressão citoplasmática dessa proteína, por sua vez, foi identificada na maioria dos CRs (n = 18; 90,0%) e CRRs (n = 19; 95,0%) (Fig. 5A, 4). Imunoexpressão nuclear de Wnt10b foi constatada em 17 (85,0%) casos de CR e em 9 (45,0%) casos de CRR. Comparados aos CRs, os CRRs apresentaram maiores percentuais de imunopositividade citoplasmática e menores percentuais de positividade nuclear para Wnt10b ($p < 0,05$) (Tabela 3) (Fig. 5A, 4). Não foram constatadas diferenças entre CRs e CRRs em relação aos percentuais de positividade membranar para Wnt10b em tecido epitelial ($p > 0,05$) (Tabela 3) (Fig. 5A, 4).

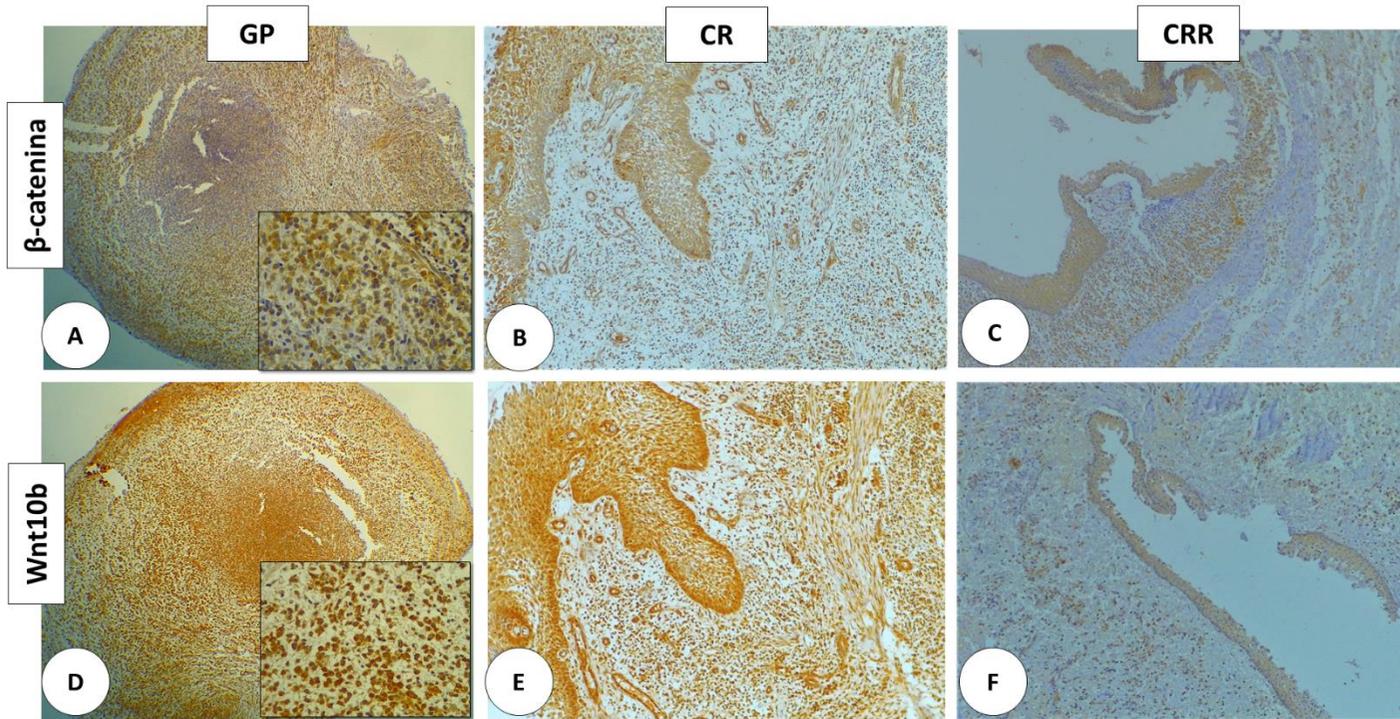


Fig 2. A e D) Fotomicrografia exibindo intensa imunoexpressão predominantemente citoplasmática da β -catenina e Wnt10b em células inflamatórias e endoteliais em GP (*Amplifier*, 100X e, em destaque, 400X). B e E) Imunoexpressão predominantemente citoplasmática e membranar da β -catenina e Wnt10b em epitélio hiperplásico de CR, e citoplasmática nas células inflamatórias e células endoteliais com infiltrado inflamatório grau III (*Amplifier*, 200X). C e F) Imunoexpressão predominantemente citoplasmática e membranar da β -catenina e Wnt10b em epitélio atrófico de CRR, e citoplasmática em infiltrado inflamatório grau I (*Amplifier*, 200X)

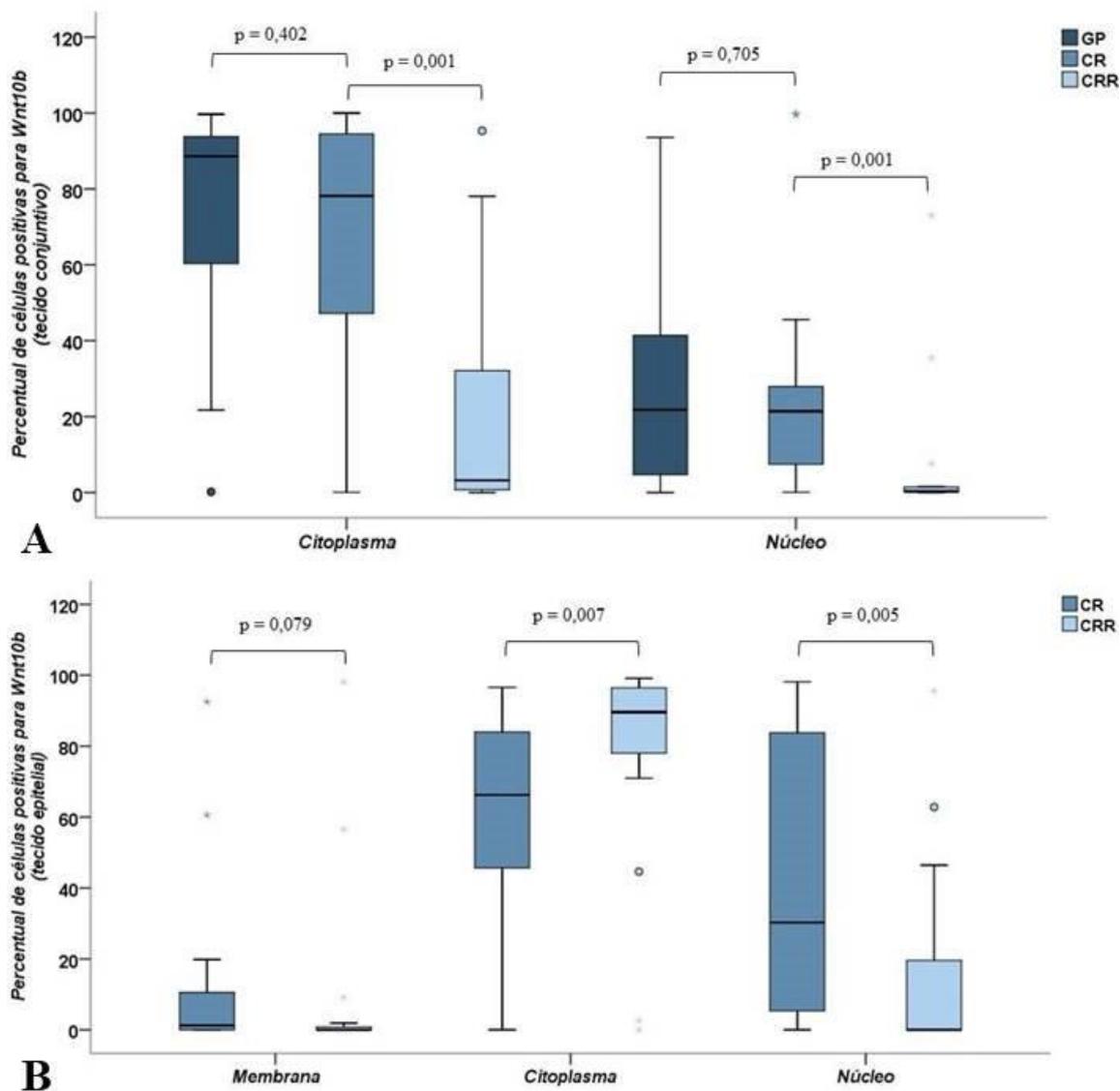


Figura 4. Gráficos de box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para Wnt10b na cápsula (A) e no revestimento epitelial (B) dos GP, CR e CRR.

Com relação às características histopatológicas das lesões (intensidade do infiltrado inflamatório e padrão do revestimento epitelial), foram identificadas diferenças estatisticamente significativas para os percentuais de imunoposição citoplasmática de Wnt10b no tecido conjuntivo das lesões e de imunoposição membranar no revestimento epitelial dos cistos. Dessa forma, lesões com infiltrado

inflamatório grau III apresentaram maiores percentuais de positividade citoplasmática quando comparadas a lesões com infiltrado inflamatório grau I/II ($p < 0,05$) (Fig. 5). Além disso, cistos com epitélio hiperplásico exibiram maiores percentuais de positividade membranar para Wnt10b quando comparados a cistos com epitélio atrófico ($p < 0,05$) (Fig. 6).

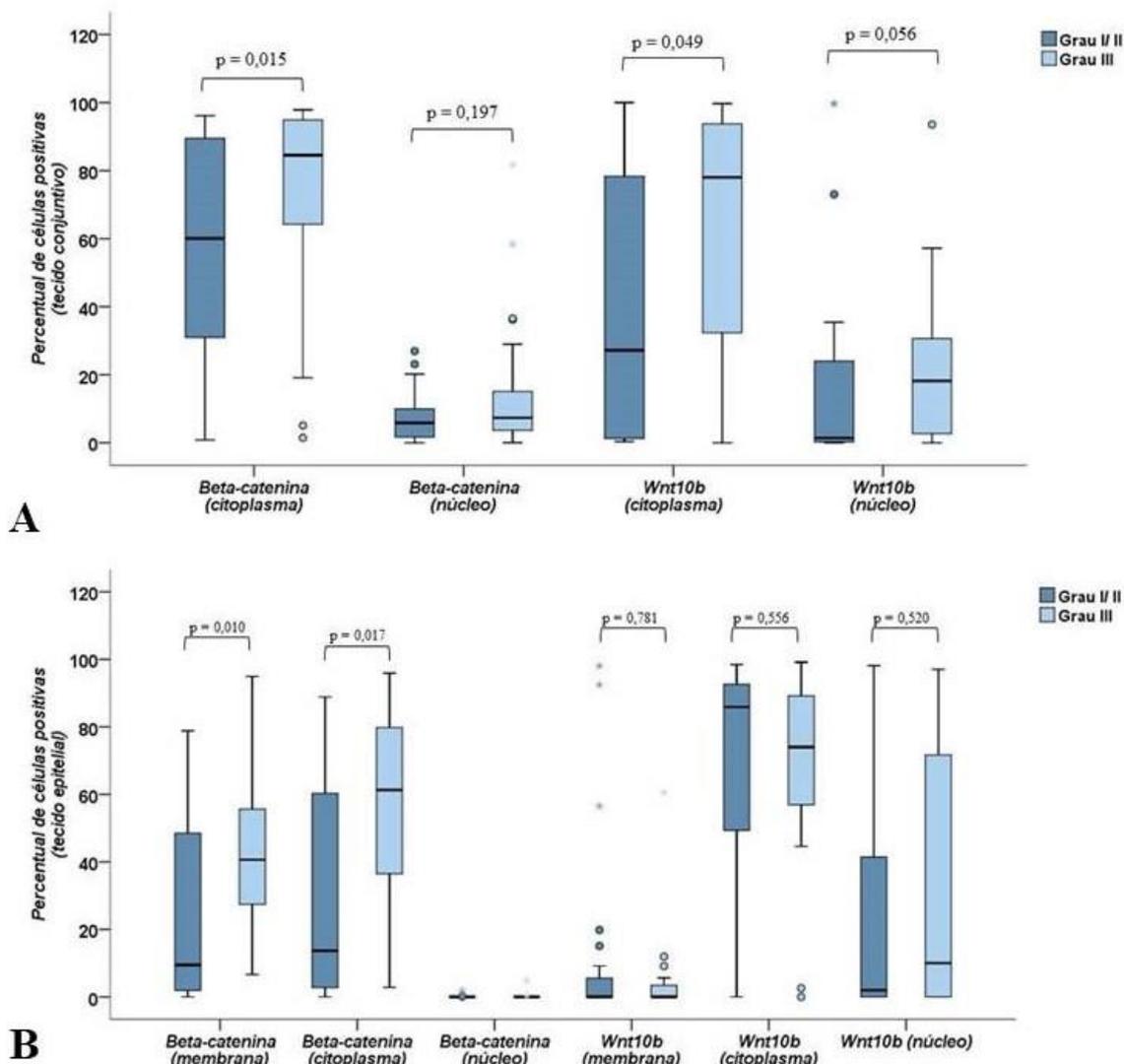


Figura 5. Gráfico de box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para beta-Catenina e Wnt10b nos compartimentos membranares, citoplasmáticos e nucleares no tecido conjuntivo (A) e no epitélio (B) dos GP, CR e CRR relacionando-os ao grau de infiltrado inflamatório.

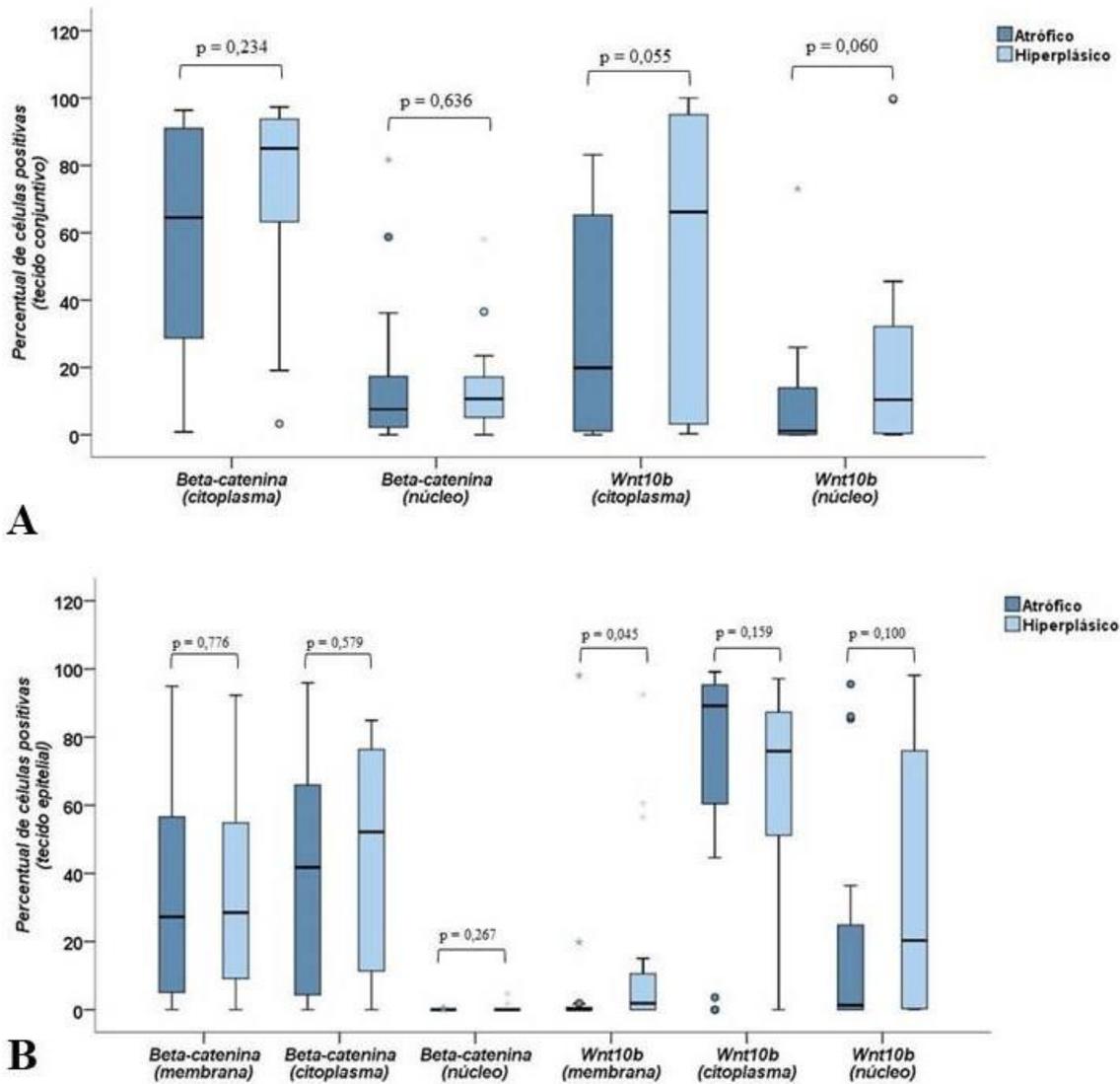


Figura 6. Gráfico de box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para β -Catenina e Wnt10b nos compartimentos membranares, citoplasmáticos e nucleares no tecido conjuntivo (A) e no epitélio (B) dos GP, CR e CRR relacionando-os ao revestimento epitelial.

Tabela 2. Tamanho da amostra, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas para β -catenina e Wnt10b no tecido conjuntivo em relação aos grupos de lesões e características histopatológicas.

Anticorpos/ Parâmetros	n	Citoplasma	Núcleo
		Mediana (variação)	Mediana (variação)
β-catenina			
<i>Grupos</i>			
GP	20	69,9 (1,4 – 97,9)	3,7 (0,1 – 29,0)
CR	20	90,1 (0,8 – 97,3)	13,9 (0,1 – 81,7)
CRR	20	58,8 (3,2 – 95,9)	5,7 (0,0 – 58,7)
<i>Infiltrado inflamatório</i>			
Grau I/II	25	60,0 (0,8 – 96,2)	5,9 (0,0 – 26,9)
Grau III	35	84,5 (1,4 – 97,9)	7,4 (0,1 – 81,7)
<i>Padrão do revestimento</i>			
Atrófico	20	64,5 (0,8 – 96,4)	7,6 (0,0 – 81,7)
Hiperplásico	20	85,0 (3,2 – 97,3)	10,7 (0,0 – 58,1)
Wnt10b			
<i>Grupos</i>			
GP	20	88,6 (0,2 – 99,7)	21,8 (0,0 – 93,6)
CR	20	78,2 (0,1 – 100,0)	21,4 (0,1 – 99,8)
CRR	20	3,2 (0,0 – 95,3)	0,3 (0,0 – 73,0)
<i>Infiltrado inflamatório</i>			
Grau I/II	25	27,2 (0,3 – 100,0)	1,4 (0,0 – 99,8)
Grau III	35	78,0 (0,0 – 99,7)	18,2 (0,0 – 93,6)
<i>Padrão do revestimento</i>			
Atrófico	20	19,9 (0,0 – 83,1)	1,1 (0,0 – 73,0)
Hiperplásico	20	66,2 (0,3 – 100,0)	10,4 (0,0 – 99,8)

Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, mínimo e máximo dos percentuais de células imunopositivas para β -catenina e Wnt10b no tecido epitelial em relação aos grupos de lesões e características histopatológicas.

Anticorpos/ Parâmetros	n	Membrana		Citoplasma		Núcleo	
		Mediana (variação)	<i>P</i>	Mediana (variação)	<i>P</i>	Mediana (variação)	<i>P</i>
β-catenina							
<i>Grupos</i>							
CR	20	51,4 (0,0 – 94,9)	0,017	62,4 (0,0 – 95,9)	0,006	0,0 (0,0 – 4,8)	0,035
CRR	20	15,4 (0,0 – 70,2)		13,4 (0,0 – 93,2)		0,0 (0,0 – 0,2)	
<i>Infiltrado inflamatório</i>							
Grau I/II	23	9,4 (0,0 – 78,8)	0,010	13,7 (0,0 – 88,9)	0,017	0,0 (0,0 – 1,8)	0,613
Grau III	17	40,7 (6,6 – 94,9)		61,3 (2,8 – 95,9)		0,0 (0,0 – 4,8)	
<i>Padrão do revestimento</i>							
Atrófico	20	27,3 (0,0 – 94,9)	0,776	41,8 (0,0 – 95,9)	0,579	0,0 (0,0 – 0,4)	0,267
Hiperplásico	20	28,5 (0,0 – 92,3)		52,1 (0,0 – 84,9)		0,0 (0,0 – 4,8)	
Wnt10b							
<i>Grupos</i>							
CR	20	1,3 (0,0 – 92,5)	0,079	66,2 (0,0 – 96,6)	0,007	30,2 (0,0 – 98,1)	0,005
CRR	20	0,0 (0,0 – 98,6)		89,6 (0,0 – 99,1)		0,0 (0,0 – 95,5)	
<i>Infiltrado inflamatório</i>							
Grau I/II	23	0,0 (0,0 – 98,1)	0,781	85,9 (0,0 – 98,4)	0,556	2,0 (0,0 – 98,1)	0,520
Grau III	17	0,0 (0,0 – 60,6)		74,0 (0,0 – 99,1)		10,0 (0,0 – 97,0)	
<i>Padrão do revestimento</i>							
Atrófico	20	0,0 (0,0 – 98,6)	0,045	89,1 (0,0 – 99,1)	0,159	1,3 (0,0 – 95,5)	0,100
Hiperplásico	20	1,9 (0,0 – 92,5)		75,9 (0,0 – 97,1)		20,3 (0,0 – 98,1)	

Correlação entre as imunoexpressões de β -catenina e Wnt10b

Nos GPs, foram identificadas correlações positivas entre as imunoexpressões nucleares e citoplasmáticas, tanto para β -catenina ($r = 0,817$; $p < 0,001$) quanto para Wnt10b ($r = 0,830$; $p < 0,001$). No revestimento epitelial dos CRs, foram observadas correlações positivas entre a imunoexpressão nuclear de Wnt10b e as imunoexpressões membranares de β -catenina ($r = 0,486$; $p < 0,05$) e Wnt10b ($r = 0,543$; $p < 0,05$). No tecido conjuntivo dos CRs, foram identificadas correlações positivas entre as imunoexpressões nucleares e citoplasmáticas, tanto para β -catenina ($r = 0,872$; $p < 0,001$) quanto para Wnt10b ($r = 0,858$; $p < 0,001$).

No revestimento epitelial dos CRRs, a imunexpressão nuclear de Wnt10b apresentou correlação positiva com as expressões membranares ($r = 0,744$; $p < 0,001$) e citoplasmáticas ($r = 0,491$; $p < 0,05$) desta mesma proteína. No tecido conjuntivo dessas lesões, foram observadas correlações positivas entre as imunexpressões nucleares e citoplasmáticas, tanto para β -catenina ($r = 0,839$; $p < 0,001$) quanto para Wnt10b ($r = 0,822$; $p < 0,001$).

5.2.5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a via de sinalização Wnt10b/ β -catenina participa na patogênese do GP, CR e CRR, exibindo papéis dependentes do compartimento e tipo celular. Sugerindo, também, que lesões com maior índice de epitélio proliferativo e maior grau de infiltrado inflamatório estão mais relacionados a uma maior participação da via Wnt10b/ β -Catenina em seu desenvolvimento.

A avaliação da imunexpressão de β -catenina revelou positividade em todos os casos de lesões periapicais no tecido conjuntivo, demonstrando sua relação com a presença das células inflamatórias e endoteliais, sugerindo um papel importante na reação inflamatória crônica e na angiogênese, respectivamente; neste último, promove possivelmente a neoangiogênese dessa região e desempenhando concomitantemente o papel na proliferação celular (23). A β -catenina obteve uma maior imunexpressão citoplasmática, estando presente em todos os casos no tecido conjuntivo e em 95% deles em tecido epitelial, sustentando a tese de que estando nessa localização seja possível assim uma maior proliferação por meio das células inflamatórias presentes.

No que diz respeito ao revestimento epitelial, essa imunexpressão se concentra de forma membranaar, em cerca de 90% das lesões císticas, em contrapartida de estudos que relatam a presença de β -catenina apenas em citoplasma e núcleo (14,16,28). Quando essa proteína é encontrada na membrana, está interagindo com as moléculas de E-caderina, actina e α -catenina, formando as junções aderentes, que promovem um microambiente adequado para a manutenção da morfogênese e integridade celular. Quando essa integridade não é mantida há a proliferação de lesões e a não estabilização do complexo de adesão célula-célula, causando assim padrão de proliferação invasivo (24). Essa ligação é primordial para a manutenção das funções epiteliais, que bloqueiam o acúmulo de β -catenina citosólica, favorecendo a sua translocação para o núcleo (23-

25, 31). No núcleo, a β -catenina desempenha papel de transdutora de sinais com o TCF/LEF, regulando assim a transcrição gênica de genes como *Axin2* e *Runx2* (32-34).

Quando analisada a imunexpressão citoplasmática, 95% dos casos de CR e CRR foram imunopositivos, corroborando diversos estudos que relatam sua presença no citoplasma (16,33). Apresentando níveis altos citoplasmáticos, dessa forma, a β -catenina acumulada, será translocada para o núcleo para efetivar junto com o seu complexo transdutor TCF/LEF, o processo de mecano-transdução de genes-alvo, realizando assim a sua função principal de emitir os sinais necessários para o funcionamento de diversos processos fisiopatológicos das células. A imunexpressão nuclear foi identificada em um pequeno número de casos e CR (35%) e CRR (10%), diferentemente do que se observa na literatura.

No que concerne a imunexpressão do Wnt10b no tecido conjuntivo pode se observar uma positividade citoplasmática/nuclear em todos os casos de CR e em grande parte dos GP e CRR, sendo significativamente inferior em CRR, sugerindo que isso acontece devido ao seu menor grau de infiltrado inflamatório e um epitélio mais atrófico. Sendo assim, o CRR possui um menor estímulo pró-inflamatório, que é uma característica marcante do Wnt10b, estar presente onde possa desempenhar uma função imunomodulatória no sentido inflamatório das lesões.

A grande expressão citoplasmática de Wnt10b nos CR sugerem assim uma maior proliferação desse tipo de sinal que a via Wnt10b/ β -Catenina possa desempenhar, levando em conta que quanto mais Wnt10b no citosol, mais estímulo para que a β -catenina seja translocada para o núcleo.

No tecido ósseo, a falta de translocação de β -catenina para o núcleo prejudica a ativação de osteoblastos relacionados e genes de osteocalcina e OPG, levando a uma osteoblastogênese reduzida e baixa massa óssea (27,30). A β -catenina regula negativamente a diferenciação de osteoclastos por meio da interrupção da diferenciação de osteoblastos, sendo assim, quando o RANKL é inibido pelo OPG causa diminuição significativa da osteoclastogênese e posterior reabsorção óssea (26).

Lesões com infiltrado inflamatório grau III apresentaram maior positividade citoplasmática e cistos com epitélio com padrão hiperplásico exibiram maiores percentuais de imunexpressão membranar para Wnt10b, sugerindo uma possível atividade proliferativa (21). Sabe-se, portanto, que a via de sinalização Wnt está

envolvida na modulação de respostas imunes durante a inflamação (35), exercendo funções pró-inflamatórias e imunomodulatórias (33), sendo assim, nas lesões císticas sugere-se que o papel inflamatório e imune esteja presente, desempenhando papel na proliferação da lesão cística.

No que concerne, às correlações positivas encontradas em nosso estudo, sugere-se que a via Wnt10b/ β -catenina esteja envolvida intimamente em processo pró-inflamatório e imune das lesões císticas. Quando está ligada ao estímulo bacteriano como é o caso dos GP e CR ou em casos em que o estímulo já foi retirado como em CRR, o Wnt10b exerce seu papel para a translocação de β -catenina e assim, ocorra a transdução de genes-alvo. Com a ativação dessa via, é possível que ocorra um certo desequilíbrio na razão RANKL e OPG, interferindo no processo de osteoclastogênese e da inflamação.

Em suma, nossos resultados sugerem que há participação da via de sinalização Wnt10b/ β -catenina na patogênese das lesões periapicais, revelando assim um possível papel pró-inflamatório e imunomodulatório dessa via.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento pelo fornecimento da bolsa de pesquisa pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15 (6): 348-81.
2. Tavares DP, Rodrigues JT, Dos Santos TCRB, Armada L, Pires FR. Clinical and radiological analysis of a series of periapical cysts and periapical granulomas diagnosed in a Brazilian population. *J Clin Exp Dent*. 2017; 9, (1): e129-35.
3. Martins R, Armada L, dos Santos TC, Pires FR. Comparative Immunoexpression of ICAM-1, TGF- β 1 and ki-67 in periapical and residual cysts. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017 Jan 1;22 (1):e24-30.
4. Alvares PR, Arruda JAA de, Silva LVO, et al. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha in periapical lesions. *J Endod*, 2018; 44 (12).

5. Garcia CC, et al. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*. 2007; 12(8): 585-90.
6. Lin LM, Huang GTJ, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod*. 2007; 33 (8): 908-916.
7. Andrade ALDL, Nonaka CFW, Gordon-Núñez MA, et al. Immunoexpression of Interleukin 17, Transforming Growth Factor b1, and Forkhead Box P3 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. *J Endod*. 2013; 39 (8): 990-94.
8. Kammer PV, Mello FW, Rivero ERC. Comparative analysis between developmental and inflammatory odontogenic cysts: retrospective study and literature review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2020; 24: 73–84.
9. Tan X, Huang D, Zhou W, et al. Dickkopf-1 may regulate bone coupling by attenuating wnt/ β -Catenin signaling in chronic apical periodontitis. *Arc Oral Bio*. 2018; 86: 94-100.
10. Baum R, Gravalles EM. Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases. *Curr Osteoporos Rep*. 2014; 12 (1): 9-16.
11. Gon H, Fumoto K, Ku Y, et al. WNT5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells. *Mol Bio Cell*. 2013; 24: 3764-74.
12. Souza LM de, Alves JM Dos S, Martins C DA S, et al. Immunoexpression of canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats. *Inflamm Res*. 2019; 68: 889-900.
13. Kocemba KA, Groen RWJ, Andel HV et al. Transcriptional silencing of the WNT-antagonist DKK-1 by promoter methylation is associated with enhanced WNT signaling in advanced multiple myeloma. *Plos One*. 2012; 7 (2): 1-11.
14. Lin J, Ye Q, Wang Y, et al. WNT/ β -Catenin signaling regulates pathogenesis of human middle ear cholesteatoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019; 12 (4): 1154-62.
15. Monroe DG, Mcgee-Lawrence ME, Oursler MJ, et al. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*. 2012; 492: 1–18.
16. Stevens JR, Miranda-Carboni GA, Singer MA, et al. Wnt10b deficiency results in age-dependent loss of bone mass and progressive reduction of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res*. 2010; 25: 2138-47.
17. Huang Y, Liu L, Liu A. Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases. *Life Sciences*. 2018; 209: 249–254.
18. Kantaputra PN, Hutsadaloi A, Kaewgahya M, et al. WNT10B mutations associated with isolated dental anomalies. *Clin Genet*. 2018; 93 (5): 992-999.
19. Wend P, Wend, K, Krum SA, et al. The role of WNT10B in physiology and disease. *Acta Physiol*. 2012; 204: p. 34-51.
20. Peixoto RF, et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arc Oral Bio*. 2012; 57 (9): 1159-64.
21. Moreira PR, Santos DF, Martins RD, et al. CD57+ cells in radicular cyst. *Int Endod J*. 2000; 33 (2): 99-102.
22. Brito LNS, Almeida MMR De L, Souza LB DE, et al. Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *J Endod*. 2018; 44 (5): 728-733.

23. Sousa LM de, Alves JMdosS, Martins, et al. Immunoexpression of canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats. *Inflamm Res*. 2019; 68 (10):889-900.
24. Santos HBdeP, Medeiros HDdeM, Mafra RP, et al. Regulation of Wnt/ β catenin pathway may be related to RegY in benign epithelial odontogenic lesions. *J Oral Maxillofac. Pathol*. 2019; 128 (1) 43-51.
25. Hao F, Liu J, Zhong, M, et al. Expression of E-cadherin, vimentin and β -catenin in Ameloblastoma and association with clinicopathological characteristics of Ameloblastoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(1):199-207.
26. Albers J, Keller J, Baranowsky A, et al. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *J Cell Biol*. 2013; 200 (4): 537–549.
27. Naruse H, Itoh S, Itoh Y, et al. The Wnt/ β -catenin signaling pathway has a healing ability for periapical periodontitis. *Nature*. 2021; 11:19673.
28. Miao CG, Yang YY, He X, et al. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal*. 2013; 25: p. 2069–78.
29. Matzelle M, Gallant MA, Condon KW, et al. Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the WNT signaling pathway. *Arthritis Rem*. 2012; 64 (5): 1540-50.
30. Lerner UH, Ohlsson C. The WNT system: background and its role in bone. *J Intern Med*. 2015; 277: 630–49.
31. Voronkov A, Krauss S. WNT/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharma Des*. 2013; 19: 634-64.
32. Xiao CY, Pan, YF, Guo XH, et al. Expression of β -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Rheumatol*, v. 40, p. 26–33, 2011.
33. Gatica-Andrades M, Vagenas D, Kling J, et al. WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. *Blood Adv*. 2017; 1:1274–86.
34. Humphries AC, Mlodzik M. From instruction to output: Wnt/PCP signalling in development and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2017; 51: 110–6.
35. Jridi I, Canté-Barett K, Pike-Overzet K, et al. Inflammation and Wnt signaling target for immunomodulatory therapy? *Front Cell Dev Biol*. 2021; 8.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados, pode se sugerir que:

- Todas as lesões obtiveram imunexpressão de β -catenina e Wnt10b, demonstrando percentuais de imunopositividades altos como a β -catenina presente em todos os casos com marcação citoplasmática em tecido conjuntivo e 95% em tecido epitelial. Quanto ao Wnt10b, foi imunomarcado em todos os compartimentos celulares do tecido epitelial das lesões císticas e em citoplasma e núcleo tecido conjuntivo, sugerindo um papel importante desta via nas lesões periapicais.
- A presença de β -catenina em membrana e citoplasma nas células epiteliais reforçam seu papel na adesão intercelular e em seu papel citosólico para transdução de sinais no núcleo;
- Wnt10b presente em citoplasma e núcleo nos evidenciam uma proteína que realiza seu papel pró-inflamatório no citoplasma e junto com a β -catenina interfere em diversos processos no núcleo, como a transdução de sinais dos genes e possivelmente interferir na osteoclastogênese no núcleo.
- Em CRs, a β -catenina demonstrou uma maior imunexpressão quando os casos apresentavam epitélio hiperplásico e grau de infiltrado inflamatório III, sugerindo assim, que há uma maior proliferação celular das lesões e inflamação nesse microambiente.
- Em CRRs, a imunexpressão de Wnt10b obteve uma maior expressão em casos com revestimento epitelial mais atrófico, possuindo infiltrado inflamatório grau II, sugerindo assim, que a proteína tenha capacidade de atuar em lesões independente do seu grau de inflamação.

REFERÊNCIAS

- ALBERS, J.; KELLER, J.; BARANOWSKY, A.; BEIL, F. T.; CATALA-LEHNEN, P.; SCHULZE, J.; AMLING, M.; SCHINKE, T. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 537–549, 2013.
- ALVARES, P. R.; ARRUDA, J. A. A. de; SILVA, L. V. O.; SILVA, L. P. da; NASCIMENTO, G. J. F. do; SILVEIRA, M. M. F. da; SOBRAL, A. P. V. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha in periapical lesions. **J Endod**, v. 44, n. 12, 2018.
- ALVARES, P.R.; ARRUDA, J. A.; SILVA, L.P.; NASCIMENTO, G. J.; SILVEIRA, M. F. da; SOBRAL, A. P. V. Immunohistochemical expression of TGF- β 1 and MMP-9 in periapical lesions. **Braz Oral Res**, v. 31, n. e51, 2017.
- ANDRADE, A. L. D. L.; NONAKA, C. F. W.; GORDON-NÚÑEZ, M. A.; FREITAS, R. A.; GALVÃO, H. C. 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. 990-94, 2013.
- BAI, Y.; SHA, J.; KANNO, T. The role of carcinogenesis – related biomarkers in the WNT pathway and their effects on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in Oral Squamous Cell. **Cancer**, v. 12, n. 555, 2020.
- BANICA, A. C.; POPESCU, S. M.; MERCUT, V.; BUSUIOC, C. J.; GHEORGHE, A. G.; TRASCA, D.-M.; BRAILA, A. D.; MORARU, A. I. Histological and immunohistochemical study on the apical granuloma. **Rom J Morphol Embryol**, v. 59, p. 811-17, 2018.
- BAUM, R.; GRAVALLESE, E. M. Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases. **Curr Osteoporos Rep**, v. 12, n. 1, p. 9-16, 2014.
- BENNETT, C. N.; LONGO, K. A.; WRIGHT, W. S.; SUVA, L. J.; LANE, T.F.; HANKENSON, K.D., et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. **Proc Natl Acad Sci**, v.102, p. 3324-9, 2005.
- BRITO, L. N. S.; ALMEIDA, M. M. R. DE L.; SOUZA, L. B. DE; ALVES, P. M.; NONAKA, C. F. W.; GODOY, G. P. Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **J Endod**, v. 44, n. 5, p. 728-733, 2018.
- CHEN, X.; YANG, J.; EVANS, P. M.; LIU, C. Wnt signaling: the good and the bad. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 40, n. 7, p. 577–594, 2008.
- CALISKAN, M. K.; KAVAL, M. E.; TEKIN, U.; ÜNAL, T. Radiographic and histological evaluation of persistent periapical lesions associated with endodontic failures after apical microsurgery. **Int Endod J**, v. 49, p.1011-19, 2016.
- CHEN, Z.-Y.; DU, Y.; WANG, L.; LIU, X. -H.; GUO, J.; WENG, X. -D. MiR-543 promotes cell proliferation and metastasis of renal cell carcinoma by targeting Dickkopf 1 through the WNT/ β -catenin signaling pathway. **J. Cancer**, v. 9, n.20, p. 3660-3668, 2018.

- COLLINS, F. L.; RIOS-ARCE, N. D.; MCCABE, L. R.; PARAMESWARAN, N. Cytokine and hormonal regulation of bone marrow immune cell Wnt10b expression. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, e0181979, 2017.
- DA SILVA, F. R.; PADILHA, E. Z.; CÂNDIDO, V. S.; CAVASSIM, R.; PEREIRA, A. C.; HEBLING, E. Relationship between quality of root canal obturation and periapical lesion in elderly patients: a systematic review. **Gerodontology**, v. 33, p. 290–298, 2016.
- DESSAUNE NETO, N.; PORPINO, M. T. M.; ANTUNES, H. dos S.; RODRIGUES, R. C. V.; PEREZ, A. R.; PIRES, F. R.; SIQUEIRA JR, J. F.; ARMADA, L. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. **J Appl Oral Sci**, v. 26, e20170455, 2018.
- DE SOUZA LC, CAVALLA F, MAILI L, GARLET GP, VIEIRA AR, SILVA RM, LETRA A. WNT gene polymorphisms and predisposition to apical periodontitis. **Sci Rep**. V. 12, n. 9, e18980, dez/2019.
- DUAN, P.; BONEWALD, L. F. The Role of the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Formation and Maintenance of Bone and Teeth. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 77, p. 23–29, 2016.
- DUTRA, S. N.; PIRES, F. R.; ARMADA, L.; AZEVEDO, R. S. Immunoexpressions of WNT/ β -Catenin signaling pathway proteins in ameloblastoma and calcifying cystic odontogenic tumor. **J Clin Exp Dent**, v. 9, n.1, e136-40, 2017.
- EJAZ, I.; GHAFOR, S. WNT signaling pathway in oral lesions. **J Pak Med Assoc**, v. 69, n.11, p. 1687-92, 2019.
- ESTRELA, C.; GUEDES, O.A.; RABELO, L.E., et al. Detection of apical inflammatory root resorption associated with periapical lesion using different methods. **Braz Dent J**, v. 25, p. 404–8, 2014.
- FLAHERTY, M. P.; KAMERZELL, T. J.; DAWN, B. Progress in molecular biology and translational. **Science**, v. 111, p. 153–174, 2012.
- FERREIRA, L. G. V.; ROSIN, F. C. P.; CORRÊA, L. Analysis of interleukin 17A in periapical abscess and granuloma lesions. **Braz Oral Res**, v.30, n.1, 2016.
- GARCIA, C. C. et al. The post-endodontic periapical lesion: histology and etiopathogenic aspects. **Med Oral Pathol Oral Cir Bucal**, v.12, n.8, p. 585-90, 2007.
- GATICA-ANDRADES M, VAGENAS D, KLING J, NGUYEN TTK, BENHAM H, THOMAS R, KÖRNER H, VENKATESH B, COHEN J, BLUMENTHAL A. WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. **Blood Adv**, v. 1, p. 1274–86, 2017.
- GLINKA, A.; WU, W.; DELIUS, H., et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. **Nature**, v. 391, p. 357–362, 1998.
- GOES, P.; DUTRA, C.; LÖSSER, L.; HOFBAUER, L. C.; RAUNER, M.; THIELE, S. Loss of DKK-1 in osteocytes mitigates alveolar bone loss in mice with periodontitis. **Front Immunol**, v. 10, 1-8, 2019.

GON, H.; FUMOTO, K.; KU, Y.; MATSUMOTO, S.; KIKUCHI, A. WNT5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells. **Mol Bio Cell**, v. 24, p. 3764-74, 2013.

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. **J Oral Maxillofac Res**, v. 2, n. 4, 2011.

HIRATA, H.; HINODA, Y.; NAKAJIMA, K.; KAWAMOTO, K.; NI VENO, K.; YAMAMURA, S.; ZAMAN, M. S.; KHATRI, G.; CHEN, Y.; SAINI, S.; MAJID, S.; DENG, G.; ISHII, N.; DAHIYA, R. WNT antagonist DKK1 act as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 128, p. 1793-1803, 2011.

HUANG, Y.; LIU, L.; LIU, A. Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases. **Life Sciences**, v. 209, p. 249–254, 2018.

HUMPHRIES AC, MLODZIK M. From instruction to output: Wnt/PCP signalling in development and cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 51, p. 110–6, 2017.

INTINI, G.; NYMAN, J. S. DKK1 haploinsufficiency requires expression of BMP2 for bone anabolic activity. **Bone**, v.75, p.-151-60, 2015.

JAKOVLJEVIC, A.; KNEZEVIC, A.; KARALIC, D.; SOLDATOVIC, I.; POPOVIC, B.; MILASIN, J., et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: correlation with clinical and histological findings. **Aust Endod J**, v. 41, n. 2, p. 72-7, 2015.

JOHNSON, N. R.; GANNON, O. M.; SAVAGE, N. W.; BATSTONE, M. D. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. **J Investig Clin Dent**, v. 5, p. 9-14, 2014.

JRIDI, I.; CANTÉ-BARETT.; PIKE-OVERZET, K.; STAAL, F. J. T. Inflammation and Wnt signaling target for immunomodulatory therapy? **Front Cell Dev Biol**. V. 8, 2021.

KAMMER, P. V.; MELLO, F. W.; RIVERO, E. R. C. Comparative analysis between developmental and inflammatory odontogenic cysts: retrospective study and literature review. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 24, p. 73–84, 2020.

KANTAPUTRA, P. N.; HUTSADALOI, A.; KAEWGAHYA, M.; INTACHAI, W.; GERMAN, R.; KOPARAL, M.; LEETHANAKUL, C.; TOLUN, A.; CAIRNS, J. R. K. WNT10B mutations associated with isolated dental anomalies. **Clin Genet**, v. 93, n. 5, p. 992-999, 2018.

KOBAYASHI, Y.; MAEDA, K.; VEHARA, S.; YAMASHITA, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by WNT signaling. **Inflamm Regen**, v. 31, n. 5, 413-19, 2011.

KOCEMBA, K. A.; GROEN, R. W. J.; ANDEL, H. V.; KERSTEN, M. J.; MAHTOUK, K.; SPAARGAREN, M.; PALS, S. T. Transcriptional silencing of the WNT-antagonist DKK-1 by promoter methylation is associated with enhanced WNT signaling in advanced multiple myeloma. **Plos One**, v. 7, v. 2, p. 1-11, 2012.

LERNER, U. H.; OHLSSON, C. The WNT system: background and its role in bone. **J Intern Med**, v. 277, p. 630–49, 2015.

- LIN L. M.; RICUCCI, D.; LIN, J.; ROSENBERG, P. A. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. **J Endodontics**, v. 35, p. 607–15, 2009.
- LIN, J.; YE, Q.; WANG, Y.; ZENG, Y. WNT/ β -Catenin signaling regulates pathogenesis of human middle ear cholesteatoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 12, n. 4, 1154-62, 2019.
- LIN, L. M.; HUANG, G. T.-J.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **J Endod**, v. 33, n. 8, p. 908-916, 2007.
- LU, J.; DUAN, Y.; ZHANG, M.; WU, M.; WANG, Y. Expression of Wnt3a, Wnt10b, b-catenin and DKK1 in periodontium during orthodontic tooth movement in rats. **Acta Odontol Scand**, v. 74, p. 217-223, 2016.
- MATZELLE, M.; GALLANT, M. A.; CONDON, K. W.; WALSH, N. C.; MANNING, C. A.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; BURR, D. B.; GRAVALESSE, E. M. Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the WNT signaling pathway. **Arthritis Rem**. V. 64, n.5, 1540-50. 2012.
- MIAO, C. G.; YANG, Y. Y.; HE, X.; LI, X. F.; HUANG, C.; HUANG, Y.; ZHANG, L.; LV, X. W.; JIN, Y.; LI, J. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. **Cell Signal**, v. 25, p. 2069–78, 2013.
- MOHAMMED, M. K.; SHAO, C.; WANG, J.; WEI, Q.; WANG, X.; COLLIER, Z., et al. Wnt/beta-catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. **Genes Dis**, v. 3, p. 11-40, 2016.
- MONROE, D. G.; MCGEE-LAWRENCE, M. E.; OURSLER, M. J.; WESTENDOR, J. J. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. **Gene**, v. 492, p. 1–18, 2012.
- MORAES, M. de; LUCENA, H. F. de; AZEVEDO, P. R. M. de; QUEIROZ, M. G. de; COSTA, A. de L. L. Comparative Immunohistochemical expression of RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cyst. **Arc Oral Bio**, v. 56, p. 1256-63, 2011.
- MOREIRA, P. R.; SANTOS, D. F.; MARTINS, R. D.; GOMEZ, R. S. CD57+ cells in radicular cyst. **Int Endod J**, v. 33, n. 2, p. 99-102, 2000.
- MUGLALI, M.; KOMERIK, N.; BULUT, E.; YARIM, G. F.; CELEBI, N.; SUMER, M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **J Oral Pathol Med**, v. 37, p.185-9, 2008.
- NAIR, P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 6, p. 348-81, 2004.
- NAIR, P. N. R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **Int Endod J**, v. 39, p. 249-81, 2006.
- NARUSE H, ITOH S, ITOH Y, KAGIOKA T, ABE M, HAYASHI M. The Wnt/ β -catenin signaling pathway has a healing ability for periapical periodontitis. **Sci Rep**. V. 4, n. 1, e19673, out/ 2021.

- NGOC, V. T. N.; LIEN, N. V. T.; HANG, L. M.; TUNG, D. T.; NGA, V. T.; THE, H. P.; CHU, D. T. Radicular cyst in a primary molar following pulp therapy with gutta percha: A case report and literature review. **J Clin Exp Dent**, v. 11, n. 1, e85-90, 2019.
- NIKOLIC, N.; JAKOVLEVIC, A.; CARKIC, J.; BELJIC-IVANOVIC, K.; MILETIC, M.; SOLDATOVIC, I.; ANDRIC, M.; IVANOVIC, V.; MILASIN, J. Notch signaling pathway in apical periodontitis correlation with bone resorption regulators and proinflammatory cytokines. **J Endod**, v. 45, n. 2, p. 123-28, 2019.
- PEIXOTO, R. F., et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. **Arc Oral Bio**, v. 57, n. 9, p. 1159-64, 2012.
- RABELO, F. S.; DA MOTA, L. M.; LIMA, R. A.; LIMA, F. A.; BARRA, G. B.; DE CARVALHO, J. F.; AMATO, A. A. The Wnt signaling pathway and rheumatoid arthritis. **Autoim Ver**, v. 9, p. 207–10, 2019.
- REINHOLD, S.; BLANKESTEIJN, M. W. WNT/ β -Catenin inhibitor Dickkopf 1: A novel predictor for cardiovascular and cerebrovascular events. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 39, p. 121-123, 2019.
- SANTOS, S. C. L. T.; COUTO, L. A.; FONSECA, J. M.; XAVIER, F. C. A.; FIGUEIREDO, A. C. L.; FREITAS, V. S.; FREITAS, R. A.; SANTOS, J. N.; HENRIQUES, A. C. G. Participation of osteoclastogenic factors in immunopathogenesis of human chronic periapical lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 46, p. 846-852, 2017.
- SATO, M.; YAMAMOTOA, H.; HATANAKAA, Y.; NISHIJIMAB, T.; JIROMARUA, R.; YASUMATSUC, R.; TAGUCHID, K.; MASUDAE, M.; NAKAGAWAC, T.; ODAA, Y. Wnt/ β -catenin signal alteration and its diagnostic utility in basal cell adenoma and histologically similar tumors of the salivary gland. **Pathol Res Pract**, v. 204, n. 14, p. 586-592, 2018.
- SHANG, S.; HUA, F.; HU, Z-W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. **Oncotarget**, vol. 8, n. 20, pp: 33972-33989, 2017.
- SHI, J.; CHI, S.; XUE, J.; YANG, J.; LI, F.; LIU, X. Emerging role and therapeutic implication of WNT signaling pathways in autoimmune diseases. **J Immunol Res**. 2016.
- SOUZA, L. B.; GORDÓN-NÚÑEZ, M. A.; NONAKA, C. F. W.; MEDEIROS, M. C.; TORRES, T. F.; GUEDES-EMILIANO, G. B. Odontogenic cysts: demographic profile in a Brazilian population over a 38-year period. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 4, p. 583–90, 2010.
- SOUZA, L. M. de; ALVES, J. M. DOS S.; MARTINS, C. DA S.; PEREIRA, K. M. A.; GOES, P.; GONDIM, D. V. Immunoexpression of canonical Wnt and NF- κ B signaling pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats. **Inflamm Res**, v. 68, p. 889-900, 2019.
- SPEIGHT, P.; SOLUK, T. M. Odontogenic cysts of inflammatory origin. In: El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, et al., eds. WHO Classification of Head and Neck Tumours. Lyon: **IARC Press**, p. 232–3, 2017.

STEVENS, J.R.; MIRANDA-CARBONI, G.A.; SINGER, M.A.; BRUGGER, S. M.; LYONS, K. M.; LANE, T. F. Wnt10b deficiency results in age-dependent loss of bone mass and progressive reduction of mesenchymal progenitor cells. **J Bone Miner Res**, v. 25, p. 2138-47, 2010.

STOETZER, M.; NICKEL, F.; RANA, M.; LEMOUND, J.; WENZEL, D.; VON SEE, C.; GELLRICK, N. C. Advances in assessing the volume of odontogenic cysts and tumors in the mandible: a retrospective clinic trial. **Head Face Med**, v. 9, n. 14, 9-14, 2013.

SUI, X.; DENG, S.; LIU, M.; FAN, L.; WANG, Y.; XU, H.; SUN, Y.; KISHEN, A.; ZHANG, Q. Constitutive activation of β -catenin in differentiated osteoclasts induces bone loss in mice. **Cell Physiol Biochem**. V. 48, p. 2091-2102, 2018.

TAKAHASHI-YANAGA, F.; SASAGURI, T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) - mediated signal transduction pathway: Expression of β -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **J Pharmacol Sci**, v.109, p. 179–183, 2009.

TAN, X.; HUANG, D.; ZHOU, W.; YAN, L.; YUE, J.; LU, W.; SONG, D.; ZHOU, X.; YE, L.; ZHANG, L. Dickkopf-1 may regulate bone coupling by attenuating wnt/ β -Catenin signaling in chronic apical periodontitis. **Arc Oral Bio**, v. 86, p. 94-100, 2018.

TANG Y, ZHOU X, GAO B, XU X, SUN J, CHENG L, ZHOU X, ZHENG L. Modulation of Wnt/ β -catenin signaling attenuates periapical bone lesions. **J Dent Res**. V. 93, n. 2, p. 175-82, fev/2014.

TAVARES, D. P.; RODRIGUES, J. T.; DOS SANTOS, T. C. R. B.; ARMADA, L.; PIRES, F. R. Clinical and radiological analysis of a series of periapical cysts and periapical granulomas diagnosed in a Brazilian population. **J Clin Exp Dent**, v. 9, n. 1, e129-35, 2017.

VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of β -catenin. **EMBO J**, v. 31, n. 12, p. 2714-2736, 2012.

VORONKOV, A.; KRAUSS, S. WNT/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. **Curr Pharma Des**. V. 19, p. 634-64, 2013.

WEBER, M.; RIES, J.; BUTTNER-HEROLD, M.; GEPPERT, C.-I.; KESTING, M.; WEHRHAN, F. Differences in inflammation and bone resorption between apical granulomas, radicular cysts and dentigerous cysts. **J Endod**, v. 45, n.10, p. 1200-08, 2019.

XIAO, C. Y.; PAN, Y. F.; GUO, X. H.; WU, Y. Q.; GU, J. R.; CAI, D. Z. Expression of β -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Scand J Rheumatol**, v. 40, p. 26–33, 2011.

YANG F, HUANG D, XU L, XU W, YI X, ZHOU X, YE L, ZHANG L. Wnt antagonist secreted frizzled-related protein I (sFRP1) may be involved in the osteogenic differentiation of periodontal ligament cells in chronic apical periodontitis. **Int Endod J**. V. 54, n.5, p. 768-779, mai/2021.

ZHANG, R.; HUANG, S.; WANG, L. Histochemical localization of Dickkopf-1 in induced rat periapical lesions. **J Endod**, v. 40, n.9, p. 1394-99, set, 2014.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do comitê de Ética em Pesquisa da UEPB

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA / UEPB - PRPGP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT (Wnt10, β -Catenina e DKK-1) EM GRANULOMAS PERIAPICAIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS RADICULARES RESIDUAIS

Pesquisador: POLLIANNA MUNIZ ALVES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35613220.3.0000.5167

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.197.082

Apresentação do Projeto:

Um estudo laboratorial caracterizado pela análise, registro e quantificação das Imunoexpressões das proteínas WNT 10b, -Catenina e DKK-1 em GP, CR e CRR.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avallar, por meio de Imunoistoquímica, a expressão de WNT 10b, -Catenina e DKK-1 em GP, CR e CRR.
4.2

Objetivos específicos - Avallar, morfológicamente, os casos de GPs, CRs, CRRs quanto Intensidade do Infiltrado Inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, e o padrão de revestimento epitelial das lesões císticas.

- Analisar a Imunoexpressão de WNT10b, -Catenina e DKK-1 em GP, CR e CRR, especificando o compartimento celular de sua expressão (núcleo, citoplasma, membranas).
- Relacionar a Imunoexpressão de WNT10b, -Catenina e DKK-1 com a Intensidade do infiltrado Inflamatório (graus I, II e III).
- Avallar possíveis correlações entre as Imunoexpressões de WNT10b, -Catenina e DKK-1 em cada grupo de lesão (GP, CR e CRRs).
- Relacionar as Imunoexpressões de WNT10b, -Catenina e DKK-1 com o padrão de revestimento

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA / UEPB - PRPGP



Continuação do Parecer: 4.187.082

epitelial dos CRs e CRRs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto apresenta riscos mínimos pois os blocos das lesões estão em arquivo. Estas lesões foram originadas do atendimento do serviço. O Laboratório de Patologia bucal da UEPB atende muitos municípios que não apresentam este serviço. Será assegurada a não exposição dos dados pessoais dos pacientes, pelo uso de codificações no banco de dados, garantindo a confidencialidade dos dados. Os benefícios superam os riscos ao permitir maior conhecimento da patogênese de aspectos da doença e possível potencial terapêutico da proteína a ser estudada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta do projeto é relevante ao explorar a patogênese de lesões bucais e o potencial efeito terapêutico de uma proteína. Os resultados desta pesquisa podem contribuir positivamente aos estudos sobre lesões bucais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: anexada;

Autorização Institucional: anexada;

Declaração de concordância com projeto de pesquisa: anexada;

Termo de Compromisso do Pesquisador Responsável: Deve ser apontada a questão de riscos, benefícios, se há ônus ao paciente.

TCLE: há a justificativa para a ausência.

Recomendações:

O projeto está adequado ao que se propõe e é justificada a ausência do TCLE. As lesões são encaminhadas para o serviço por cirurgiões dentistas de todo o estado e as lesões ficam armazenadas em blocos, o que inviabiliza a aquisição do TCLE a cada pesquisa a ser realizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta todos os termos de apresentação obrigatórios e está aprovado salvo melhor entendimento.

Considerações Finais a critério do CEP:

Trata-se de um estudo laboratorial com lesões armazenadas em arquivo. Verificar a real necessidade de enviar ao CONEP.

Endereço: Av. das Bananeiras, 354 - Campus Universitário
Bairro: Bodocórego CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA / UEPB - PRPGP**



Continuação do Parecer: 4.187.062

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1506001.pdf	24/07/2020 17:36:54		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	Termo_de_autorizacao_coletadadedose marquivos.pdf	24/07/2020 17:32:56	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermodeAutorizacaoInstitucional.pdf	24/07/2020 17:31:43	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_assinada.pdf	15/07/2020 20:33:45	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_PE SQUISADOR.pdf	15/07/2020 20:11:05	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	Termo_compromisso_coletadadedosam arquivos.pdf	15/07/2020 20:09:17	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JUSTIFICATIVA_DISPENSA_TCLE.pdf	15/07/2020 20:07:52	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito
Declaração de concordância	Declaracao_concordancia.pdf	15/07/2020 20:07:23	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.pdf	15/07/2020 19:59:35	POLLIANNA MUNIZ ALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 06 de Agosto de 2020

Assinado por:

**Valeria Ribeiro Nogueira Barbosa
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. das Bananeiras, 3571 - Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

ANEXO B – Normas para submissão de trabalhos ao periódico *Journal of Endodontics*.

GUIDE FOR AUTHORS

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.

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
 - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
 - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
 - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on Ethics in publishing.

Studies in humans and animals

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

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patente applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places:

1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'.
2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not

under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Use of inclusive language

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

Author contributions

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

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 are available online.

Copyright

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

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

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

Role of the funding source

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

Open access

The Journal of Endodontics supports Open Access. Following acceptance, authors have the option to make their article freely accessible for a fee of \$3,000. Please see the following link to learn more about open access options: <https://www.elsevier.com/about/open-science/open-access>.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.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). 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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

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

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. Please use superscripts at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. 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.

Formatting of funding sources

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

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

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

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

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.

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

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. Further information on the preparation of electronic artwork.

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 and shading in table cells.

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 highly encouraged. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article.

An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is:

VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>.

Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Data references

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

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

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

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. 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.

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.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more

information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

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

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

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

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.

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