



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

**CHRISTANY RODRIGUES FERREIRA**

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À  
AUTOFAGIA (Atg7, p62, LC3A e p-mTOR) EM CISTOS RADICULARES, CISTOS  
DENTÍGEROS E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2021**

**CHRISTANY RODRIGUES FERREIRA**

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À  
AUTOFAGIA (Atg7, p62, LC3A e p-mTOR) EM CISTOS RADICULARES, CISTOS  
DENTÍGEROS E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS**

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

**Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**

CAMPINA GRANDE – PB

2021

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

F383a Ferreira, Christany Rodrigues.  
Análise imunohistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62, LC3A e p-mTOR) em cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos [manuscrito] / Christany Rodrigues Ferreira. - 2021.  
107 p. : il. colorido.  
  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.  
"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."  
1. Cisto radicular. 2. Cisto dentígero. 3. Cistos odontogênicos. 4. Autofagia. 5. Imuno-histoquímica. I. Título  
21. ed. CDD 617.63

**CHRISTANY RODRIGUES FERREIRA**

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À  
AUTOFAGIA (Atg7, p62, LC3A e p-mTOR) EM CISTOS RADICULARES, CISTOS  
DENTÍGEROS E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS**

DATA DA DEFESA: 09/07/2021

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro/ UFCG**  
**Membro Titular (1º Examinador)**



---

**Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez/ UEPB**  
**Membro Titular (2º Examinador)**



---

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

*Dedicatória*

---

A Deus por ter plantado em meu coração o sonho de seguir na docência e me proporcionar toda força necessária para trilhar este caminho.

*In memoriam*, Maria das Dores Brito, por toda dedicação direcionada a minha vida, assim como pelo amor e carinho que sempre transbordou para todos em sua volta. Dedico essa conquista a pessoa que mais se doou em prol da família.

Eterno amor vovó Nita.

“Porque Deus amou o mundo, de tal maneira, que deu seu filho unigênito, para que todo aquele que Nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.”

(João 3:16).

# *Agradecimientos*

---

## **Agradecimentos especiais**

Ao **Professor Doutor Cassiano Francisco Weege Nonaka**, meu orientador durante o curso de mestrado. Agradeço por toda dedicação que desempenha para com seus alunos, pacientes, colegas de trabalho e orientandos.

O aprendizado que construí durante esses dois anos foi além de minhas expectativas como profissional e isso devido a sua presença diária nos apoiando para alcançar nossos objetivos. Especialmente, aprendi que ser professor é uma caminhada para pessoas sensíveis, dispostas a abdicar diariamente na tentativa de formar profissionais em um sistema que por vezes é precário e retrógrado.

Meu curso de mestrado foi bem atípico, pois grande parte ocorreu durante uma pandemia e passar meses sem ter contato presencial com meu orientador foi um grande desafio, mas para quem conhece o Dr. Nonaka sabe que ele não deixaria suas orientandas desamparadas ou as atividades paradas. Nesse momento, ficou ainda mais evidente a pessoa inspiradora e o professor exemplar que ele representa.

Sim, foram tempos difíceis e diante de tudo isso meu orientador esteve sempre lá com todas as preocupações com minha pesquisa (e de tantos outros alunos), minhas aulas, meu aprendizado, meu bem-estar e com meu futuro. Não tenho palavras para agradecer por tudo que o senhor fez e faz. Apenas posso colocá-lo em minhas orações e pedir a Deus que guarde, guie e proteja sua vida e família.



## **Agradecimentos**

A **Deus** por ter me guiado até aqui, sustentado, fortalecido e colocado em meu caminho pessoas abençoadas.

A meus pais, **Joelma Rodrigues Ferreira** e **Israel da Silva Ferreira**, por terem acreditado em meus sonhos e me incentivado a não perder o foco nos momentos em que eu mesma já não tinha forças para prosseguir.

A minha irmã, **Lilyan Rodrigues Ferreira**, por ser minha amiga fiel e conselheira. Sempre estive ao meu lado em todos os momentos como uma grande fonte de coragem e alegria para meus dias.

Aos meus avôs, **Arlindo Rodrigues de Brito** e **Lucia Maria da Silva Santos**, porque mesmo sem entender muito bem o que seria um mestrado me incentivaram e forneceram tudo que estava ao seu alcance para me ajudar. A **Dona Fátima** que ao lado do meu avô foram meus alicerces durante a fase de adaptação em Campina Grande.

In memoriam, aos meus avôs **Maria das Dores Brito** e **Ivanildo da Silva Ferreira**, mesmo que sem a presença física sempre fazem parte de cada uma de minhas conquistas. As lembranças de suas lutas são fonte de garra e coragem para minha vida.

A **todos meus familiares** que são grandes entusiastas com meus sonhos e sempre estão presentes em cada momento me incentivando. Em especial minha prima e colega de quarto, **Larissa da Silva Brito** por dividir comigo todas as vivências e perrengues da vida de estudante.

Ao meu noivo, **Mateus Gomes Silva**, por enfrentar ao meu lado cada uma das batalhas necessárias para que esse sonho tornasse realidade. Por ser meu incentivador, fiel companheiro de todos os momentos, minha base espiritual e emocional.

A toda **família Gomes Silva**, por me receber como filha e abraçar meus sonhos junto com Mateus.

A todos **meus professores de graduação**, por terem sido grandes exemplos de profissionais que sempre levarei guardado comigo.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB**, por terem direcionado meu aprendizado e mostrado quão alto e longe podemos alçar voos na vida acadêmica sempre mostrando a trajetória necessária.

Em especial aos professores **Dra. Polliana Muniz Alves, Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez e Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, por estarem sempre solícitos a nos direcionar na caminhada pela estomatologia e patologia oral.

Às técnicas do Laboratório de Histopatologia Oral da UEPB, **Denise Núbia Souza e Ana Luzia Araújo Batista**, por representarem bem mais que técnicas, mas sim verdadeiras amigas e companheiras durante essa caminhada.

A todos os colegas que compartilharam os dias de imunoistoquímica, fotomicrografias, contagem de células e toda a nossa rotina do Laboratório de Histopatologia Oral, **Allany, Catarina, Luana, Emanuene, Ingrid, Luan, Wliana, Walter, Lívia, Daniella e Amanda**, por tornarem dias cansativos em animados e alegres. Sempre dividindo experiências, conquistas, sorrisos e muito conhecimento. Sou grata por fazer parte dessa equipe.

Em especial a **Allany Andrade e Catarina Lima** por toda amizade e companheirismo que desenvolvemos durante esses dois anos de convivência.

A todos os **amigos da turma 2019.2** de mestrado por dividirem comigo todos os bons e maus momentos desse curso sempre regados de bom humor e um excelente convívio.

A todos **funcionários do Departamento de Odontologia da UEPB**, por trabalharem todos os dias para fornecerem um ambiente propício para realizar curso de mestrado.

À professora **Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, minha orientadora de iniciação científica e de trabalho de conclusão de curso da graduação. Grata por ser essa professora incentivadora, que direciona seus alunos durante a busca pelos seus sonhos. Uma honra e orgulho em tê-la na minha banca de dissertação.

À professora **Dra. Pollianna Muniz Alves**, por todos os ensinamentos transmitidos, dedicação e pelo exemplo de profissionalismo. Suas contribuições e vivências transmitidas foram muito importantes para minha formação.

Aos professores, **Dra. Daniela Pita** e **Dr. Cassiano Nonaka**, coordenadores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB por todo trabalho desempenhado todos os dias pelo bom funcionamento do programa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram para esta pesquisa e para realização deste curso!

**“O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda. Meu coração exulta de alegria, e com o meu cântico lhe darei graças.”  
(Salmos 28:7).**

*Resumo*

---

## RESUMO

No contexto dos cistos odontogênicos, o cisto radicular (CR), o cisto dentígero (CD) e o ceratocisto odontogênico (CO) se destacam por serem os mais prevalentes. Na patogênese de lesões císticas, estudos têm destacado a participação de um mecanismo intracelular catabólico que envolve diversas proteínas, com destaque para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR. Até o momento, pouco se sabe sobre o envolvimento desse mecanismo de degradação intracelular na patogênese de cistos odontogênicos. Dessa forma, o presente estudo se propôs a analisar a imunexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62, LC3A e p-mTOR) em CRs, CDs e COs. A amostra foi constituída por 20 CRs, vinte CDs e 20 COs. Dados clínicos (sexo, idade e localização anatômica das lesões) foram coletados a partir de fichas de requisição de biópsia. No estudo morfológico, foram avaliados o padrão do revestimento epitelial e a intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs. No estudo imunoistoquímico, sob aumento de 400×, foram estabelecidos os percentuais de células positivas (núcleo e citoplasma) para as proteínas em 10 campos microscópicos do revestimento epitelial, bem como o predomínio da imunorreatividade nas camadas epiteliais. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Foi observada maior frequência de CRs com infiltrado inflamatório grau III (55,0%) e revestimento epitelial hiperplásico (60,0%). Todos os CRs, CDs e COs revelaram expressão citoplasmática de Atg7 e p62. Expressão nuclear de Atg7 e p62 foi constatada em todos os COs, bem como na maioria dos CRs (90,0% e 95,0%, respectivamente) e CDs (80,0% e 95,0%, respectivamente). Para essas proteínas, houve predomínio de imunorreatividade em camada basal/parabasal nos COs e em todas as camadas do epitélio nos CRs e CDs. Expressão citoplasmática de LC3A foi identificada na maioria dos CRs (70,0%), CDs (85,0%) e COs (65,0%). Expressão nuclear de LC3A foi observada na maioria dos CRs (70,0%) e CDs (70,0%), bem como em menor proporção dos COs (35,0%). Houve predomínio de imunorreatividade para LC3A em camada parabasal/superficial do epitélio nos COs. Por sua vez, CRs e CDs exibiram considerável variabilidade na imunorreatividade para LC3A nas camadas epiteliais. Expressão citoplasmática de p-mTOR foi observada em todos os CDs e COs, bem como em 50,0% dos CRs. Positividade nuclear para p-mTOR foi identificada com maior frequência nos CDs (70,0%), seguidos dos COs (55,0%) e CRs (25,0%). Em todos os grupos, houve predomínio de imunorreatividade para p-mTOR em camada superficial do epitélio. Foram identificados maiores percentuais de positividade citoplasmática para Atg7 nos CRs e COs quando comparados aos CDs, com diferença significativa entre os últimos ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a expressão citoplasmática de LC3A ( $p > 0,05$ ). Os maiores percentuais medianos de positividade citoplasmática para p62 e p-mTOR foram observados, respectivamente, nos CRs ( $p < 0,05$ ) e COs ( $p < 0,05$ ). Os COs apresentaram maior expressão nuclear de Atg7 em comparação aos CRs e CDs ( $p < 0,05$ ). Além disso, CRs e COs exibiram maior expressão nuclear de p62 em comparação aos CDs ( $p < 0,05$ ). Todos os grupos revelaram baixos percentuais de positividade nuclear para LC3A e p-mTOR. Não foram constatadas diferenças significativas na expressão das proteínas relacionadas à autofagia de acordo com o padrão do revestimento epitelial e a intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs ( $p > 0,05$ ). Os resultados deste estudo sugerem a participação da autofagia na patogênese dos CRs, CDs e COs. A imunexpressão das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR, no entanto, pode não estar relacionada às características histopatológicas dos CRs. Além disso, a translocação nuclear das proteínas Atg7 e p62 pode contribuir para o comportamento biológico mais agressivo dos COs.

**Palavras-chave:** Cisto radicular; Cisto dentígero; Cistos odontogênicos; Autofagia; Imuno-histoquímica.

# *Abstract*

---

## ABSTRACT

In the context of odontogenic cysts, the radicular cyst (RC), the dentigerous cyst (DC) and the odontogenic keratocyst (OKC) stand out for being the most prevalent. In the pathogenesis of cystic lesions, studies have highlighted the participation of an intracellular catabolic mechanism involving several proteins, especially Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR. Until now, little is known about the involvement of this intracellular degradation mechanism in the pathogenesis of odontogenic cysts. Thus, the present study aimed to analyze the immunoreexpression of autophagy-related proteins (Atg7, p62, LC3A and p-mTOR) in RCs, DCs and OKCs. The sample consisted of 20 RCs, twenty DCs and 20 OKCs. Clinical data (gender, age and anatomical location of the lesions) were collected from biopsy requisition forms. In the morphological study, the pattern of the epithelial lining and the intensity of the inflammatory infiltrate in the RCs were evaluated. In the immunohistochemical study, under 400× magnification, the percentages of positive cells (nucleus and cytoplasm) for proteins in 10 microscopic fields of the epithelial lining were established, as well as the predominance of immunoreactivity in the epithelial layers. The data obtained were submitted to statistical analysis using the Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ). A higher frequency of RCs with grade III inflammatory infiltrate (55.0%) and hyperplastic epithelial lining (60.0%) was observed. All RCs, DCs and OKCs revealed cytoplasmic expression of Atg7 and p62. Nuclear expression of Atg7 and p62 was found in all OKCs, as well as in most RCs (90.0% and 95.0%, respectively) and DCs (80.0% and 95.0%, respectively). For these proteins, there was a predominance of immunoreactivity in the basal/parabasal layer in OKCs and in all layers of the epithelium in RCs and DCs. Cytoplasmic expression of LC3A was identified in most RCs (70.0%), DCs (85.0%) and OKCs (65.0%). Nuclear expression of LC3A was observed in most RCs (70.0%) and DCs (70.0%), as well as in a smaller proportion of OKCs (35.0%). There was a predominance of immunoreactivity for LC3A in the parabasal/superficial layer of the epithelium in OKCs. On the other hand, RCs and DCs exhibited considerable variability in LC3A immunoreactivity in the epithelial layers. Cytoplasmic expression of p-mTOR was observed in all DCs and OKCs, as well as in 50.0% of RCs. Nuclear positivity for p-mTOR was identified more frequently in DCs (70.0%), followed by OKCs (55.0%) and RCs (25.0%). In all groups, there was a predominance of p-mTOR immunoreactivity in the superficial layer of the epithelium. Higher percentages of cytoplasmic positivity for Atg7 were identified in RCs and OKCs when compared to DCs, with a significant difference between the last two ( $p < 0.05$ ). No significant differences were observed between groups for cytoplasmic expression of LC3A ( $p > 0.05$ ). The highest median percentages of cytoplasmic positivity for p62 and p-mTOR were observed, respectively, in RCs ( $p < 0.05$ ) and OKCs ( $p < 0.05$ ). OKCs showed higher nuclear expression of Atg7 compared to RCs and DCs ( $p < 0.05$ ). Furthermore, RCs and OKCs exhibited higher nuclear expression of p62 compared to DCs ( $p < 0.05$ ). All groups showed low percentages of nuclear positivity for LC3A and p-mTOR. No significant differences were found in the expression of autophagy-related proteins according to the pattern of the epithelial lining and the intensity of the inflammatory infiltrate in the RCs ( $p > 0.05$ ). The results of this study suggest the participation of autophagy in the pathogenesis of RCs, DCs and OKCs. Nevertheless, the immunoreexpression of Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR proteins may not be related to the histopathological characteristics of RCs. Furthermore, the nuclear translocation of Atg7 and p62 proteins may contribute to the more aggressive biological behavior of OKCs.

**Keywords:** Radicular cyst; Dentigerous cyst; Odontogenic cysts; Autophagy; Immunohistochemistry.



## *Lista de ilustrações*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b>	
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das etapas e principais proteínas envolvidas na autofagia.....	31
<b>METODOLOGIA</b>	
<b>Quadro 1.</b> Elenco de variáveis analisadas no estudo.....	41
<b>Quadro 2.</b> Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	43
<b>ARTIGO</b>	
<b>Figura 1.</b> Expressão de Atg7 no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×).....	67
<b>Figura 2.</b> Boxplots relativos aos percentuais de células imunopositivas (citoplasma [A] e núcleo [B]) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR no revestimento epitelial de CRs, CDs e COs.....	68
<b>Figura 3.</b> Boxplots ilustrando os percentuais de células imunopositivas (citoplasma [A] e núcleo [B]) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com o padrão do revestimento epitelial dos CRs.....	69
<b>Figura 4.</b> Boxplots ilustrando os percentuais de células imunopositivas (citoplasma [A] e núcleo [B]) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs.....	70
<b>Figura 5.</b> Expressão de LC3A no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×).....	71
<b>Figura 6.</b> Expressão de p62 no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×).....	72
<b>Figura 7.</b> Expressão de p-mTOR no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , 200×).....	73

## *Lista de tabelas*

---

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos casos de CR, CD e CO de acordo com os dados clínicos.....	64
<b>Tabela 2.</b> Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.....	65
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos casos de CR, CD e CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR no tecido epitelial.....	66

## *Lista de abreviaturas e siglas*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AgNOR:** Do inglês *argyrophilic nucleolar organizer regions*, traduzido como regiões organizadoras nucleolares argirofílicas.
- AKT:** Refere-se à proteína quinase B.
- Atg:** Do inglês *autophagy-related protein*, refere-se à família de proteínas relacionadas à autofagia.
- Atg1:** Do inglês *autophagy-related protein 1*, traduzido como proteína 1 relacionada à autofagia.
- Atg3:** Do inglês *autophagy-related protein 3*, traduzido como proteína 3 relacionada à autofagia.
- Atg4:** Do inglês *autophagy-related protein 4*, traduzido como proteína 4 relacionada à autofagia.
- Atg5:** Do inglês *autophagy-related protein 5*, traduzido como proteína 5 relacionada à autofagia.
- Atg7:** Do inglês *autophagy-related protein 7*, traduzido como proteína 7 relacionada à autofagia.
- Atg10:** Do inglês *autophagy-related protein 10*, traduzido como proteína 10 relacionada à autofagia.
- Atg12:** Do inglês *autophagy-related protein 12*, traduzido como proteína 12 relacionada à autofagia.
- Atg13:** Do inglês *autophagy-related protein 13*, traduzido como proteína 13 relacionada à autofagia.
- Atg14:** Do inglês *autophagy-related protein 14*, traduzido como proteína 14 relacionada à autofagia.
- Atg15:** Do inglês *autophagy-related protein 15*, traduzido como proteína 15 relacionada à autofagia.
- Atg16:** Do inglês *autophagy-related protein 16*, traduzido como proteína 16 relacionada à autofagia.
- Atg17:** Do inglês *autophagy-related protein 17*, traduzido como proteína 17 relacionada à autofagia.
- Atg22:** Do inglês *autophagy-related protein 22*, traduzido como proteína 22 relacionada à autofagia.

- Atg29:** Do inglês *autophagy-related protein 29*, traduzido como proteína 29 relacionada à autofagia.
- Atg31:** Do inglês *autophagy-related protein 31*, traduzido como proteína 31 relacionada à autofagia.
- BCL-2:** Do inglês *B-cell lymphoma protein 2*, traduzido como proteína 2 de linfoma de células B.
- BNIP3:** Do inglês *BCL2 interacting protein 3*, traduzido como proteína 3 que interage com a proteína BCL2.
- CD:** Cisto dentífero.
- CO:** Ceratocisto odontogênico.
- CONEP:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.
- COX-2:** Refere-se à ciclooxigenase-2.
- DNA:** Do inglês *deoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico.
- CR:** Cisto radicular.
- GLUT-1:** Do inglês *glucose transporter 1*, traduzido como transportador de glicose 1.
- GM-CSF:** Do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, traduzido como fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos.
- Hh:** Refere-se à via de sinalização *Hedgehog*.
- HIF-1 $\alpha$ :** Do inglês *hypoxia inducible fator 1 alpha*, traduzido como fator 1-alfa induzível por hipóxia.
- IgA:** Imunoglobulina-A.
- IgG:** Imunoglobulina-G.
- IL-1:** Interleucina-1.
- IL-3:** Interleucina-3.
- IL-6:** Interleucina-6.
- Ki-67:** Refere-se à proteína Ki-67.
- LC3A:** Do inglês *microtubule-associated protein 1-light chain 3A*, traduzido como cadeia leve 3A da proteína 1 associada a microtúbulos.
- MCM3:** Do inglês *minichromosome maintenance complex component 3*, traduzido como componente 3 do complexo de manutenção de minicromossomo.
- pAMPK:** Do inglês *phosphorylated AMP-activated protein kinase*, traduzido como proteína quinase ativada por AMP fosforilada.
- p53:** Do inglês *protein 53*, refere-se ao gene *P53* ou à proteína p53.

- p62:** Do inglês *protein 62*, refere-se ao gene *P62* ou à proteína p62.
- PAS:** Do inglês *pre-autophagosome*, traduzido como pré-autofagossomo.
- PCR:** Do inglês *polymerase chain reaction*, traduzido como reação em cadeia da polimerase.
- p-mTOR:** Do inglês *phosphorylated mammalian target of rapamycin*, traduzido como proteína alvo da rapamicina em mamíferos fosforilada.
- PTCH1:** Do inglês *protein patched homolog 1*, traduzido como o gene *PTCH1* ou à proteína PTCH1.
- RNA:** Do inglês *ribonucleic acid*, traduzido como ácido ribonucleico.
- RPS6:** Do inglês *ribosomal protein S6*, traduzido como proteína ribossômica S6.
- SHH:** Refere-se à proteína *sonic hedgehog*.
- SMO:** Do inglês *smoothened*, refere-se ao gene *SMO* ou à proteína SMO.
- SQSTM1:** Do inglês *sequestosome 1*, refere-se ao gene *SQSTM1* ou à proteína SQSTM1.
- TNF- $\alpha$ :** Do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$* , traduzido como fator de necrose tumoral- $\alpha$ .
- VEGF:** Do inglês *vascular endothelial growth factor*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
- VEGFR2:** Do inglês *vascular endothelial growth factor receptor 2*, traduzido como receptor 2 do VEGF.



# *Sumário*

---

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b> 26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b> 38
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b> 38
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b> 38
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b> 40
<b>3.1</b>	<b>Considerações éticas.....</b> 40
<b>3.2</b>	<b>Caracterização do estudo.....</b> 40
<b>3.3</b>	<b>População.....</b> 40
<b>3.4</b>	<b>Amostra.....</b> 40
3.4.1	Crítérios de inclusão..... 40
3.4.2	Crítérios de exclusão..... 40
<b>3.5</b>	<b>Variáveis.....</b> 41
<b>3.6</b>	<b>Estudo clínico.....</b> 42
<b>3.7</b>	<b>Estudo morfológico.....</b> 42
<b>3.8</b>	<b>Estudo imunoistoquímico.....</b> 43
3.8.1	Método imunoistoquímico..... 43
3.8.2	Análise imunoistoquímica..... 45
<b>3.9</b>	<b>Análise estatística.....</b> 46
<b>4</b>	<b>ARTIGO.....</b> 48
<b>4.1</b>	<b>Apresentação.....</b> 48
<b>4.2</b>	<b>Artigo a ser submetido.....</b> 49
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b> 75
	<b>REFERÊNCIAS.....</b> 77
	<b>APÊNDICES.....</b> 85
	<b>ANEXOS.....</b> 88

## *Considerações iniciais*

---

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os cistos odontogênicos são caracterizados como cavidades patológicas revestidas por epitélio de natureza odontogênica (RIVERO *et al.*, 2010; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Nesse grupo, o cisto radicular (CR), o cisto dentífero (CD) e o ceratocisto odontogênico (CO) assumem posição de destaque por serem os mais prevalentes (JOHNSON *et al.*, 2014; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Contudo, essas lesões apresentam importantes diferenças com relação à patogênese e ao comportamento biológico (GABDAIL *et al.*, 2009; KECHIK; SIAR, 2018). Apesar dos avanços no conhecimento dos mecanismos responsáveis por tais diferenças, esses processos permanecem incompletamente compreendidos.

O CR é um cisto odontogênico de origem inflamatória, cuja patogênese envolve a resposta do sistema imunológico a microrganismos presentes nos sistemas de canais radiculares (NAIR, 1998; STASHENKO; TELES; SOUZA, 1998; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). É considerado o cisto mais frequente dos ossos gnáticos, representando de 42,6% a 54,6% de todos os cistos odontogênicos (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; JOHNSON *et al.*, 2014; MUZIO *et al.*, 2017; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020).

A etiopatogênese do CR está relacionada com a liberação de diversos fatores de crescimento e mediadores químicos, incluindo as quimiocinas, que estimulam a proliferação dos restos epiteliais de Mallassez (NAIR, 1998; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Após serem estimulados, os restos epiteliais formam massas celulares sólidas que posteriormente dão origem a espaços cavitários (NAIR, 2004; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Várias teorias foram propostas para explicar a formação da cavidade cística nos CRs, dentre as quais se destacam: a teoria da deficiência nutricional, a teoria do abscesso e a teoria da fusão dos cordões epiteliais (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007).

Na patogênese dos CRs estão envolvidos importantes mediadores químicos pró-inflamatórios como as interleucinas-1 (IL-1), -3 (IL-3) e -6 (IL-6), o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (GERVASIO *et al.*, 2002) e as imunoglobulinas-G (IgG) e -A (IgA) (STERN; DREIZEN; MACKLER; LEVY, 1981). Nesse sentido, Álvares *et al.* (2018) relataram a expressão e a participação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) no desenvolvimento dos CRs. O TNF- $\alpha$  atua na reabsorção óssea, ativando e estimulando os osteoclastos, e a COX-2, por sua vez, está relacionada com a angiogênese, quimiotaxia e proliferação celular (ÁLVARES *et al.*, 2018).

Ao exame clínico, o CR apresenta-se como uma lesão frequentemente assintomática, associada a um dente não vital e pode ou não gerar aumento de volume perceptível (SHIVHARE *et al.*, 2016; SUKEGAWA *et al.*, 2020). Esse cisto acomete as mulheres em até

62,1% dos casos e apresenta uma ampla distribuição etária (9 - 92 anos), com média de idade ao diagnóstico que varia de 38,1 a 48,4 anos (LIN *et al.*, 2010; MUZIO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; SUKEGAWA *et al.*, 2020).

Na grande maioria dos casos o CR é diagnosticado em exames radiográficos de rotina e apresenta-se como uma lesão radiolúcida, unilocular, bem circunscrita e associada a um dente não vital (NODA *et al.*, 2018; SANTOSH; OGLE, 2020; SUKEGAWA *et al.*, 2020). Acomete principalmente a região anterior de maxila e em especial os dentes incisivos laterais (CHEN *et al.*, 2018; MUZIO *et al.*, 2017; SUKEGAWA *et al.*, 2020). Essa lesão não tende a deslocar os dentes envolvidos, no entanto, pode causar reabsorção radicular (SANTOSH; OGLE, 2020).

Ao exame histopatológico, observa-se uma cavidade cística revestida por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado que exhibe graus variados de hiperplasia, por vezes com projeções arciformes evidentes, além de áreas de degeneração hidrópica, espongirose, corpúsculos de Rushton e excitose (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003; LIN *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2018; SANTOSH; OGLE, 2020). Células mucosas estão presentes em aproximadamente 18,1% dos casos e células ciliadas, por sua vez, em 10,7% dos CRs (TAKEDA *et al.*, 2005). A cápsula fibrosa, permeada por infiltrado inflamatório crônico, pode apresentar macrófagos espumosos, depósitos de hemossiderina, corpúsculos de Russell, calcificações distróficas e espaços negativos de cristais de colesterol (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003; LIN *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2018; SANTOSH; OGLE, 2020).

Diversas modalidades de tratamento são sugeridas na literatura para o CR, como o tratamento endodôntico convencional ou associado a apicectomia para lesões pequenas e bem circunscritas (SHIVHARE *et al.*, 2016; SANTOSH; OGLE, 2020). Por outro lado, CRs de grandes extensões ou próximos a estruturas nobres são tratados com abordagens como descompressão, enucleação e extração do dente associado (SHIVHARE *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2018; SANTOS; OGLE, 2020).

O CD, por sua vez, é um cisto de desenvolvimento associado a coroa de um dente não irrompido (JOHNSON *et al.*, 2014; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020), que apresenta uma prevalência de 14,0% a 39,7% e corresponde ao segundo cisto mais frequente dos ossos gnáticos (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; JOHNSON *et al.*, 2014; MUZIO *et al.*, 2017; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020).

A exata patogênese do CD ainda é incerta, mas sugere-se que seu desenvolvimento está associado ao acúmulo de líquido entre o epitélio reduzido do esmalte e a coroa dentária (BILODEAU; COLLINS, 2017; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Alguns estudos indicam a participação de moléculas no desenvolvimento dos CDs, como proteínas envolvidas

na proliferação celular, com destaque para p53, AgNOR e o componente 3 do complexo de manutenção de minicromossomo (MCM3) (GABDAIL *et al.*, 2009; JAAFARI-ASHKAVAND; MEHRANMEHR; ROOSTA, 2019), na angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o receptor 2 do VEGF (VEGFR2) (FRIEDLANDER *et al.*, 2015), e na inflamação, como a COX-2 (ALSAEGH *et al.*, 2017).

O CD, comumente, apresenta-se como uma lesão assintomática associada a um dente não irrompido, mas em raros casos pode retardar a erupção dentária e por vezes causar edema facial (DALEY; WY SOCKI, 1995; BUYUKKURT; OMEZLI; MILOGLU, 2010). Essa lesão é discretamente mais prevalente no sexo masculino (1.53:1) e demonstra uma ampla distribuição etária (2-81 anos), com média de idade ao diagnóstico de 34,8 anos (BUYUKKURT; OMEZLI; MILOGLU, 2010; MUZIO *et al.*, 2017). Frequentemente, os CDs estão localizados na região posterior de mandíbula (BUYUKKURT; OMEZLI; MILOGLU, 2010; MUZIO *et al.*, 2017).

Ao exame radiográfico, o CD se apresenta como uma área radiolúcida, unilocular e bem circunscrita, envolvendo a coroa de um dente incluso (DALEY; WY SOCKI, 1995; BUYUKKURT; OMEZLI; MILOGLU, 2010). Com maior frequência envolve os terceiros molares inferiores e caninos superiores. Estudos revelam que aproximadamente 2,1% dos terceiros molares impactados podem estar associados a CDs (DALEY; WY SOCKI, 1995; MELLO *et al.*, 2019).

Ao exame histopatológico, CDs são revestidos por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, com poucas camadas e interface relativamente plana com a cápsula conjuntiva adjacente (BUYUKKURT; OMEZLI; MILOGLU, 2010; BILODEAU; COLLINS, 2017). No revestimento epitelial, células mucosas estão presentes em até 23,8% dos casos e células ciliadas, por sua vez, em 10,8% dos CDs (TAKEDA *et al.*, 2005). Na cápsula fibrosa circunvizinha podem ser observados restos epiteliais odontogênicos e áreas de extravasamento hemorrágico (BUYUKKURT; OMEZLI; MILOGLU, 2010; DE PONTES SANTOS *et al.*, 2015; BILODEAU; COLLINS, 2017).

O tratamento de escolha para os CDs é a enucleação, curetagem e extração do dente associado (BILODEAU; COLLINS, 2017). A marsupialização é outra modalidade de tratamento que pode ser utilizada nos CDs, com o intuito de reduzir a lesão, preservar o dente associado e promover sua erupção (HYOMOTO *et al.*, 2003). O prognóstico dessa lesão é bom, com raros casos de recidiva (BILODEAU; COLLINS, 2017).

Ainda no contexto dos cistos odontogênicos, o CO é descrito como um cisto de desenvolvimento que possui origem a partir de remanescentes da lâmina dentária (PHILIPSEN,

1956; SHEAR; SPEIGHT, 2007) e representa de 11,6% a 20,6% dos cistos odontogênicos (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006; JOHNSON *et al.*, 2014; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Essa lesão diferencia-se das descritas anteriormente por seu comportamento clínico potencialmente agressivo, alta taxa de recorrência e associação com a síndrome de Gorlin-Goltz (PITAK-ARNNOP *et al.*, 2010; FINKELSTEIN *et al.*, 2013; ŞEREFİCAN *et al.*, 2017; BORGHESI *et al.*, 2018).

Mutações no gene *PTCH1* participam da patogênese do CO. Esse gene supressor tumoral codifica a proteína PTCH1 que atua como um regulador negativo da via de sinalização *Hh*, interagindo com as proteínas SHH e SMO, além de uma família de fatores de transcrição, denominados GLI (BARRETO *et al.*, 2000; VERED *et al.*, 2009). Assim, mutações no gene *PTCH1* resultam em ativação anormal da via *Hh*, com consequente proliferação celular desregulada (VERED *et al.*, 2009).

Muito ainda é discutido a respeito da patogênese dessa lesão e diversas moléculas são estudadas nos COs com o intuito de compreender o seu comportamento agressivo. Nesse contexto, pesquisas têm destacado a participação de células tronco (HEIKINHEIMO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2020), do transportador de glicose 1 (GLUT-1) (LEITE *et al.*, 2017), da proteína antiapoptótica BCL-2 (KACZMARZYK *et al.*, 2018; NIMMANAGOTI *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020), da COX-2 (KACZMARZYK *et al.*, 2018; NIMMANAGOTI *et al.*, 2019), de proteínas envolvidas com o reparo de DNA (DE BRITO MONTEIRO *et al.*, 2015; DE PONTES SANTOS *et al.*, 2020) e da angiogênese (NIMMANAGOTI *et al.*, 2019).

O CO é uma lesão intraóssea, assintomática, diagnosticada com frequência maior em indivíduos do sexo masculino. A idade dos pacientes pode variar de 6 a 90 anos, com média de 34,2 a 38,6 anos (LEUNG *et al.*, 2016; DE CASTRO *et al.*, 2018; SCHUCH *et al.*, 2020). Cerca de 74,5% a 77,3% dos casos acometem a mandíbula, principalmente a região posterior e o ramo ascendente (DE CASTRO *et al.*, 2018; SCHUCH *et al.*, 2020).

Ao exame radiográfico, o CO se apresenta como uma lesão radiolúcida, unilocular ou multilocular, com margens bem definidas e que pode envolver dentes inclusos (DE CASTRO *et al.*, 2018; SCHUCH *et al.*, 2020). Estudos mostram que os casos multiloculares representam de 24,3% a 51,8% dos COs (LEUNG *et al.*, 2016; DE CASTRO *et al.*, 2018; SCHUCH *et al.*, 2020). Existem casos relatados que variam de 1 a 150 mm de diâmetro (SCHUCH *et al.*, 2020).

Histopatologicamente, o CO é revestido por um epitélio pavimentoso estratificado paraceratinizado, com 6 a 10 camadas de células de espessura e superfície corrugada (BINNIE, 1999; FINKELSTEIN *et al.*, 2013; BELLO, 2016). As células da camada basal são colunares ou cuboidais, organizadas em paliçada, com núcleos hipercromáticos (FINKELSTEIN *et al.*,

2013; BELLO, 2016). Proliferações de células da camada basal em direção ao tecido conjuntivo subjacente são descritos no CO (STOELINGA, 2005; BELLO, 2016). A cápsula fibrosa, geralmente não inflamada, pode conter microcistos satélites em aproximadamente 20% dos casos, assim como restos de epitélio odontogênico (STOELINGA, 2005; BELLO, 2016).

A cápsula cística fina e friável, bem como a frequente separação entre epitélio e tecido conjuntivo, são características que podem contribuir para as altas taxas de recorrência dos COs (BINNIE, 1999; STOELINGA, 2005). A presença de microcistos satélites e restos de epitélio odontogênico na cápsula fibrosa, associada ao padrão de crescimento infiltrativo dos COs entre as trabéculas ósseas, são outros fatores que possivelmente favorecem a recorrência dessas lesões (STOELINGA, 2005; FINKELSTEIN *et al.*, 2013).

Nesse contexto, muito é discutido a respeito do tratamento dos COs visto que a enucleação simples está relacionada a altas taxas de recorrência, que variam de 19,5% a 60% (PITAK-ARNNOP *et al.*, 2010; FINKELSTEIN *et al.*, 2013; DE CASTRO *et al.*, 2018). Sendo assim, pesquisas sugerem a associação de outras técnicas, como a descompressão prévia, osteotomia periférica ou curetagem química para reduzir as recorrências (FINKELSTEIN *et al.*, 2013). Estudos mostraram que a realização da osteotomia periférica e o uso da solução de Carnoy após a enucleação estão relacionados com menores taxas de recorrência, que variam de 4,5% a 11,4% (LEUNG *et al.*, 2016; DE CASTRO *et al.*, 2018). Por sua vez, abordagens mais agressivas, como a ressecção cirúrgica, podem determinar percentuais de recorrência próximos a zero, porém implicam em maior morbidade ao paciente (LEUNG *et al.*, 2016; DE CASTRO *et al.*, 2018).

Diversos estudos foram desenvolvidos com o intuito de compreender as diferenças no comportamento biológico e na patogênese dos CRs, CDs e COs. Estudos recentes ressaltam que essas diferenças podem estar relacionadas à expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular (GABDAIL *et al.*, 2009; KECHIK; SIAR, 2018), na hipóxia (DA COSTA *et al.*, 2018), na degradação de peptídeos (ALI *et al.*, 2019) e na quimiotaxia (LUCENA, 2020). Ainda nesse contexto, investigações revelaram que proteínas relacionadas com a autofagia poderiam participar do desenvolvimento desses cistos odontogênicos, no entanto pouco sabe-se sobre o mecanismo de ação da autofagia na patogênese dos CRs, CDs e COs (CHAI SUPARAT *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; ZHONG *et al.*, 2015; MEDEIROS, 2019).

A autofagia é um processo que ocorre em todas as células eucariotas, nas quais, quando estão em privação de nutrientes ou sob estresse metabólico, ocorre a degradação de componentes citoplasmáticos e reciclagem de macromoléculas (organelas e proteínas), com a

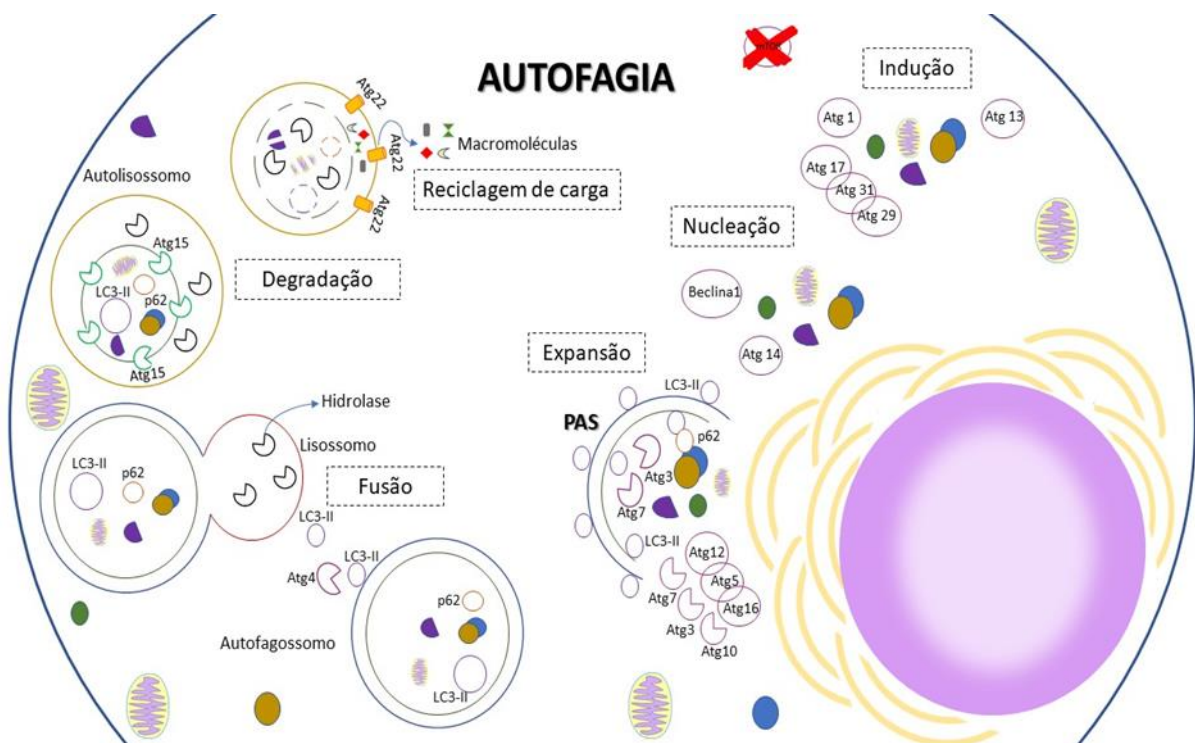


finalidade de sintetizar elementos essenciais que atuem como fonte de energia (RAVIKUMAR *et al.*, 2010; YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016).

O termo “autofagia” geralmente indica a macroautofagia (YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016). Esse processo bastante dinâmico, resumidamente apresentado na figura 1, envolve múltiplas proteínas e pode ser dividido em cinco etapas principais: indução, nucleação, expansão, fusão e degradação/ reciclagem de carga (YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016). O material citosólico que será degradado é “sequestrado” por uma estrutura transitória denominada de pré-autofagossomo (PAS), posteriormente englobado por uma vesícula de membrana dupla nomeada de autofagossomo. Em sequência, os autofagossomos se unem aos lisossomos, dando origem aos autolisossomos, e o conteúdo citosólico aprisionado é degradado (RAVIKUMAR *et al.*, 2010; YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016). Por fim, as macromoléculas resultantes são liberadas no citoplasma através de várias permeases (YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016).

A autofagia é mediada por diversas moléculas que são responsáveis por detectar sinais que refletem status de energia, níveis de nutrientes e fatores que coordenam o crescimento celular, como por exemplo a via proteína quinase B/ proteína alvo da rapamicina em mamíferos (Akt/mTOR) que é o principal regulador negativo da autofagia (LAPLANTE; SABATINI, 2012; APPUHAMY *et al.*, 2014; YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016). A proteína mTOR consiste em uma serina-treonina quinase alvo de rapamicina, que pode constituir dois complexos proteicos designados de mTORC1 (sensível à rapamicina) e mTORC2 (insensível à rapamicina) (LAPLANTE; SABATINI, 2012; APPUHAMY *et al.*, 2014).

**Figura 1.** Representação esquemática das etapas e principais proteínas envolvidas na autofagia.



O complexo mTORC1 participa da via Akt/mTOR e controla outros importantes processos celulares, como síntese de proteínas e lipídios (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Em situações onde os níveis de energia, oxigênio e aminoácidos estão adequados para a sobrevivência celular, a Akt fosforila mTOR no sítio de ativação Ser2448, e subsequentemente a mTOR realiza autofosforilação da Ser2481. A proteína mTOR fosforilada (p-mTOR) é responsável por fosforilar diretamente as proteínas relacionadas à autofagia 1 (Atg1) e 13 (Atg13), culminando na inibição da autofagia por impedir a formação e ativação do complexo Atg17-Atg29-Atg31, essencial na fase de indução da montagem do PAS (KAMADA *et al.*, 2010; LAPLANTE; SABATINI, 2012; YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016).

Por outro lado, quando a célula está sob estresse metabólico, mTOR permanece inativa e, dessa forma, permite que a autofagia tenha início (YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016). Durante o processo de expansão e fusão das membranas do PAS várias proteínas relacionadas à autofagia (Atgs) são envolvidas, incluindo Atg3, Atg7, cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3) e o complexo Atg12-Atg5-Atg16 (KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012; YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016). A Atg7 é considerada uma enzima essencial para autofagia, participando da conjugação e ativação do complexo Atg12-Atg5-Atg16 e da lipidação de LC3 (TANIDA *et al.*, 2001; ANTONUCCI *et al.*, 2015).

A LC3 faz parte de uma família de três proteínas, denominadas LC3A, LC3B e LC3C, cada uma dessas apresentando duas variantes (I e II) (KOUKOURAKIS *et al.*, 2015; FRUDD; BURGOYNE; BURGOYNE, 2018). A conjugação de LC3 à membrana do PAS ocorre após o início da autofagia, tornando LC3-II uma importante molécula que pode ser utilizada para mensurar a ativação desse processo catabólico (NAIR *et al.*, 2012; NATH *et al.*, 2014). Além disso, a detecção de autofagossomos por meio da imunomarcação para LC3 pode fornecer uma estimativa da densidade autofagossômica na célula (KOUKOURAKIS *et al.*, 2015).

O processo de sequestro do material citosólico pelas membranas autofagossômicas é mediado por uma importante proteína, denominada p62 ou sequestossomo 1 (SQSTM1), que pode associar-se a várias outras proteínas e é capaz de alterá-las (KIRKIN *et al.*, 2009; JOHANSEN; LAMARK, 2011; KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012). Outra característica importante da p62 é sua habilidade de transportar sinais entre núcleo e citoplasma (PANKIV *et al.*, 2010; JOHANSEN; LAMARK, 2011).

A p62 atua como um receptor seletivo para cargas ubiquitinadas que devem ser degradadas (JOHANSEN; LAMARK, 2011). Essa proteína se liga, por meio de um domínio C-terminal, aos agregados ubiquitinados que são compostos por estruturas, como mitocôndrias

danificadas, peroxissomos, bactérias, vírus e proteínas ribossômicas (KIRKIN *et al.*, 2009; JOHANSEN; LAMARK, 2011). Subsequentemente, esses agregados são acoplados ao PAS, após a p62 ligar-se diretamente às proteínas LC3 presentes nas membranas do PAS, garantindo a posterior degradação seletiva da carga sequestrada e também da p62 após a fusão autolisossômica (KIRKIN *et al.*, 2009; KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012). Sendo assim, quando a autofagia está inativa o nível intracelular de p62 é aumentado, por outro lado, caso este processo catabólico inicie ocorre redução da concentração de p62 intracelular. (KOMATSU; KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012; JIANG; MIZUSHIMA, 2015).

No que concerne ao mecanismo de degradação nuclear, sabe-se que ocorre de forma distinta da autofagia citoplasmática (LUO *et al.*, 2016). A geração do autofagossomo na nucleofagia é semelhante à exocitose, pois utiliza a própria membrana nuclear para encapsular o material alvo (LUO *et al.*, 2016). Em sequência, uma membrana sequestradora pode ser formada próxima ao núcleo e a vesícula formada é incluída em autolisossomos (LUO *et al.*, 2016).

As proteínas envolvidas especificamente no processo de nucleofagia ainda não são totalmente conhecidas. Pesquisas demonstraram, em núcleos de linhagens celulares, expressão de Atg7 e Atg5, bem como desacetilação nos domínios de LC3 que se ligam à Atg7 (HUANG; LIU, 2015; HUANG *et al.*, 2015). Outras proteínas, como Atg3 e Beclina-1, também foram relacionadas à nucleofagia (LUO *et al.*, 2016), assim como, a localização perinuclear de LC3, p62 e quinase ativadora de autofagia (ULK1) em estudo com ceratinócitos diferenciados (AKINDURO *et al.*, 2016).

A nucleofagia desempenha um papel importante no processo de modificação pós-transcricional do RNA, além de manter a homeostase do DNA nuclear (LUO *et al.*, 2016). Alguns estudos destacaram a importância da nucleofagia em processos fisiológicos e patológicos, incluindo câncer e doenças autoimunes (KRICK *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2016).

A autofagia citoplasmática também desempenha papéis críticos na fisiologia celular e defeitos nesta via estão relacionados a uma ampla gama de processos patológicos, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas (QU *et al.*, 2003; DALBY *et al.*, 2010; JIANG; MIZUSHIMA, 2014; YIN; PASCUAL; KLIONSKY, 2016; XU *et al.*, 2018). Alguns estudos destacaram a participação da autofagia na patogênese de doenças císticas (ZHU *et al.*, 2017; CHOU *et al.*, 2018; MASYUK *et al.*, 2018). Nesse sentido, pesquisas em modelo animal evidenciaram que alterações na autofagia participam da patogênese das doenças policísticas renal (ZHU *et al.*, 2017; CHOU *et al.*, 2018) e hepática (MASYUK *et al.*, 2018). Além disso, foi constatado que diante de abordagens farmacológicas que reduzem o fluxo autofágico,

ocorreu uma diminuição na cystogênese hepática de 50%, ao utilizar a bafilomicina, e de 32%, ao se utilizar hidroxicloroquina (MASYUK *et al.*, 2018).

No que concerne à patogênese de lesões odontogênicas, a autofagia foi pouco estudada. Nos artigos publicados com essa temática foi evidenciado que a maquinaria molecular da autofagia está possivelmente envolvida na arquitetura dos tecidos, diferenciação celular e prognóstico das lesões (OKADA *et al.*, 2014; SHARP *et al.*, 2019).

Um estudo imunoistoquímico avaliou a via Akt/mTOR em ameloblastomas, COs, CDs e folículos dentários, e constatou que a expressão da forma fosforilada de Akt (Thr308) foi superior nos ameloblastomas quando comparados aos COs e CDs (CHAI SUPARAT *et al.*, 2013). Por outro lado, ameloblastomas e COs apresentaram níveis similares de expressão de outra forma fosforilada de Akt (Ser473). Nos CDs, as imunorexpressões de Akt (Ser473) e da proteína ribossômica S6 (RPS6), um marcador da ativação da mTOR, se apresentaram superiores às observadas nos folículos dentários e inferiores às constatadas em COs e ameloblastomas. Dessa maneira, os autores concluíram que a via Akt/mTOR se apresenta ativa nos ameloblastomas, COs e CDs, e pode influenciar no desenvolvimento dessas lesões (CHAI SUPARAT *et al.*, 2013).

Okada *et al.* (2014) avaliaram a imunorexpressão das proteínas LC3, p62 e Atg7 em folículos dentários, ameloblastomas unicísticos e ameloblastomas sólidos. Nos ameloblastomas, foi identificada maior expressão das proteínas relacionadas à autofagia em células epiteliais próximas à membrana basal, quando comparadas às células localizadas na região central das lesões. Foi constatada maior imunopositividade para LC3 e p62 nas lesões primárias em comparação às recorrentes. Além disso, quando comparados aos ameloblastomas sólidos, os ameloblastomas unicísticos exibiram maior imunoreatividade para LC3, p62 e Atg7. Segundo Okada *et al.* (2014), os resultados obtidos sugerem que a autofagia pode estar envolvida com a arquitetura tecidual do ameloblastoma, bem como no prognóstico dessa lesão.

Zhong *et al.* (2015) analisaram a participação da autofagia na degradação das conexinas 32 e 43 em COs. As conexinas fazem parte de uma família de mais de 20 análogos estruturais que compõem as junções intercelulares comunicantes. Os autores relataram uma correlação negativa entre as imunorexpressões das conexinas e das proteínas LC3 e p62. Além disso, análises com imunofluorescência de dupla marcação demonstraram que estruturas positivas para conexinas 32 e 43 estavam cercadas por estruturas positivas para LC3 e colocalizadas em vesículas contendo p62. Com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram o envolvimento da autofagia na regulação da degradação das conexinas 32 e 43 nos COs.

Uma pesquisa recente avaliou a autofagia e a capacidade clonogênica em células epiteliais e mesenquimais derivadas de ameloblastomas sólidos e células derivadas de odontoma (SHARP *et al.*, 2019). Os autores identificaram maior clonogenicidade e maiores expressões de proteínas relacionadas à autofagia (LC3, p62 e melanorregulina) nas células epiteliais de ameloblastoma quando comparadas às células mesenquimais dessa neoplasia e às células derivadas de odontoma. Além disso, as células epiteliais de ameloblastoma foram enxertadas em um modelo animal e promoveram a regeneração tumoral. Os resultados obtidos sugeriram que a autofagia desempenha um importante papel na sobrevivência e reativação do ameloblastoma (SHARP *et al.*, 2019).

Em estudo imunoistoquímico, proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) foram avaliadas em COs isolados e COs associados à síndrome de Gorlin-Goltz (MEDEIROS, 2019). Em comparação aos COs isolados, os COs associados à síndrome de Gorlin-Goltz apresentaram maior expressão citoplasmática de Atg7 e maior expressão nuclear de Atg7 e p62. A imunorreatividade para Atg7 foi constatada, predominantemente, em camada basal/parabasal do revestimento epitelial das lesões. Ao mesmo tempo, essa região do revestimento epitelial dos COs revelou baixa imunorreatividade citoplasmática para o inibidor autofágico p-mTOR. Diante desses resultados, a autora sugeriu um importante papel da autofagia na patogênese dos COs. Além disso, de acordo com Medeiros (2019), a ativação da autofagia pode contribuir para o comportamento biológico mais agressivo dos COs associados à síndrome de Gorlin-Goltz.

Ainda no contexto das lesões odontogênicas, pesquisas sugerem que a autofagia seria capaz de participar da regulação de outros processos celulares, como apoptose, proliferação celular e hipóxia (ZHU *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2018).

Zhu *et al.* (2013) avaliaram uma possível relação entre autofagia e apoptose em CRs e granulomas periapicais. Por meio de análises com imunofluorescência de dupla marcação, foi observada uma colocalização parcial entre a expressão de LC3 e a positividade para TUNEL, tanto nos CRs quanto nos granulomas periapicais. Todos os CRs e granulomas periapicais apresentaram expressão citoplasmática de LC3, incluindo células epiteliais, inflamatórias e semelhantes a fibroblastos. Além disso, utilizando imunoistoquímica, foi constatada maior expressão de LC3 nos cistos quando comparados aos granulomas periapicais ( $p = 0,001$ ). Adicionalmente, em microscopia eletrônica de transmissão, foram observados autofagossomos e autolisossomos colocalizados com núcleos apoptóticos em células dos CRs. Os resultados obtidos evidenciaram a complexidade da inflamação periapical e sugeriram uma possível relação entre autofagia e apoptose em CRs e granulomas periapicais (ZHU *et al.*, 2013).

Por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa e imunohistoquímica, Li *et al.* (2014) analisaram a expressão de proteínas relacionadas à autofagia (Beclina-1, LC3, p62, Atg5 e Atg7), proliferação celular (Ki-67) e apoptose (BCL-2) em COs e CRs. Em comparação aos CRs, os COs apresentaram maior expressão gênica de Beclina-1, Atg5 e Atg7, bem como maior imunexpressão de Beclina-1, Atg7, LC3 e p62. Adicionalmente, nos COs, foram constatadas correlações significativas entre as expressões de proteínas relacionadas à autofagia e de Ki-67, assim como entre as expressões de Beclina-1 e de BCL-2. Segundo os autores, esses resultados evidenciam um importante papel da autofagia na regulação da atividade antiapoptótica e da proliferação celular, bem como sugerem um possível vínculo entre a ativação da autofagia e o potencial de crescimento nos COs (LI *et al.*, 2014).

Huang *et al.* (2018) avaliaram a imunexpressão de proteínas relacionadas à autofagia (Atg5-12, p62, Beclina-1, LC3-I e LC3-II) e à hipóxia (HIF-1 $\alpha$ , BNIP3 e pAMPK) em CRs, granulomas periapicais e polpas dentárias. De acordo com os autores, a imunopositividade para as proteínas pAMPK, HIF-1 $\alpha$ , BNIP3, Beclina-1 e Atg5-Atg12 foi superior nas lesões periapicais, quando comparadas às polpas dentárias. Por outro lado, a expressão de LC3-I e p62 foi superior no tecido pulpar normal. Além disso, foram observados autofagossomos e autolisossomos nas lesões, ao utilizar microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados refletiram um aumento na atividade autofágica nos CRs e granulomas periapicais, além de sugerirem que a hipóxia poderia induzir a autofagia nessas lesões (HUANG *et al.*, 2018).

# *Objetivos*

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar as imunorexpressões de proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62, LC3A e p-mTOR) em CRs, CDs e COs.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Classificar os casos de CR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório e o padrão do revestimento epitelial;
- Analisar a imunorexpressão das proteínas Atg7, p62, LC3A e p-mTOR em relação às camadas epiteliais dos CRs, CDs e COs;
- Determinar os percentuais de células imunopositivas para Atg7, p62, LC3A e p-mTOR no componente epitelial das lesões;
- Relacionar as imunorexpressões das proteínas Atg7, p62, LC3A e p-mTOR com as características morfológicas dos CRs (intensidade do infiltrado inflamatório e padrão do revestimento epitelial).



# *Metodologia*

---

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Considerações éticas**

A presente pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetida à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), respeitando a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Conforme parecer nº 4.245.830 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

#### **3.2 Caracterização do estudo**

O estudo desenvolvido constitui em uma pesquisa observacional analítica, caracterizada pelo registro e quantificação das imunorexpressões das proteínas Atg7, p62, LC3A e p-mTOR em CRs, CDs e COs.

#### **3.3 População**

A população do estudo foi constituída por todos os casos de CRs, CDs e COs, diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB.

#### **3.4 Amostra**

O estudo foi realizado com uma amostra não probabilística de conveniência, constituída por 60 espécimes fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina, obtidos a partir dos registros do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB. Destes, 20 casos corresponderam a CRs, vinte a CDs e 20 a COs.

##### **3.4.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CO, CD e CR que apresentaram material biológico suficiente para realização dos estudos morfológicos e imunoistoquímicos, cujos blocos de parafina estavam em bom estado de conservação.

##### **3.4.2 Critérios de exclusão**

Para todos os grupos de lesões (COs, CDs e CRs), foram excluídos da pesquisa os casos provenientes de biópsia incisional e aqueles submetidos previamente à descompressão. Especificamente para os CDs e COs, foram excluídos os casos que se apresentaram, após

análise histopatológica, secundariamente inflamados. Casos de CO associados à síndrome de Gorlin-Goltz também foram excluídos do estudo.

### 3.5 Variáveis

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

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

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
Tipo de lesão	Classificação considerando a origem (desenvolvimento ou inflamatório) e características morfológicas.	- Cisto radicular; - Cisto dentífero; - Ceratocisto odontogênico.	Independente (Categórica)
Infiltrado inflamatório	Intensidade de células inflamatórias presentes na capsula fibrosa dos CRs.	- Grau I; - Grau II; - Grau III.	Independente (Categórica)
Revestimento epitelial	Padrão predominante de revestimento epitelial nos CRs.	- Atrófico; - Hiperplásico.	Independente (Categórica)
Atg7	Percentual de células epiteliais imunopositivas.	- Citoplasma; - Núcleo.	Dependente (Quantitativa)
Distribuição da Atg7	Predomínio da imunorreatividade de acordo com as camadas epiteliais.	- Imunomarcação em camada basal/ parabasal; - Imunomarcação em camada parabasal/ superficial; - Imunomarcação em camada superficial; - Imunomarcação em toda a extensão do revestimento.	Dependente (Categórica)
p62	Percentual de células epiteliais imunopositivas.	- Citoplasma; - Núcleo.	Dependente (Quantitativa)
Distribuição da p62	Predomínio da imunorreatividade de acordo com as camadas epiteliais.	- Imunomarcação em camada basal/ parabasal; - Imunomarcação em camada parabasal/ superficial; - Imunomarcação em camada superficial;	Dependente (Categórica)

		- Imunomarcção em toda a extensão do revestimento.	
LC3A	Percentual de células epiteliais imunopositivas.	- Citoplasma; - Núcleo.	Dependente (Quantitativa)
Distribuição da LC3A	Predomínio da imunorreatividade de acordo com as camadas epiteliais.	- Imunomarcção em camada basal/ parabasal; - Imunomarcção em camada parabasal/ superficial; - Imunomarcção em camada superficial; - Imunomarcção em toda a extensão do revestimento.	Dependente (Categórica)
p-mTOR	Percentual de células epiteliais imunopositivas.	- Citoplasma; - Núcleo.	Dependente (Quantitativa)
Distribuição da p-mTOR	Predomínio da imunorreatividade de acordo com as camadas epiteliais.	- Imunomarcção em camada basal/ parabasal; - Imunomarcção em camada parabasal/ superficial; - Imunomarcção em camada superficial; - Imunomarcção em toda a extensão do revestimento.	Dependente (Categórica)

### 3.6 Estudo clínico

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

### 3.7 Estudo morfológico

A partir do material biológico incluído em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Posteriormente, sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), um patologista oral experiente e sem conhecimento dos dados clínicos relacionados aos casos, realizou a análise histopatológica dos CRs.

Foram analisados a intensidade do infiltrado inflamatório na cápsula fibrosa e o padrão de revestimento epitelial dos CRs. A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com a metodologia utilizada por Peixoto *et al.* (2012). A partir da porção luminal das lesões em direção à periferia, foi considerado 1 campo microscópico, sob o aumento de 200×. Os espécimes que apresentaram células inflamatórias restritas à um terço do campo microscópico, foram classificadas como grau I; as lesões com infiltrado inflamatório presente em até dois terços foram definidas como de grau II; e os espécimes que exibiram células inflamatórias em mais de dois terços foram categorizados como de grau III (APÊNDICE A).

Para a análise do padrão do revestimento epitelial nos CRs, foi utilizada a metodologia proposta por Moreira *et al.* (2000). Com base no padrão predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os cistos que apresentaram em sua maior extensão o revestimento epitelial constituído por 2 a 10 camadas de células de espessura e interface plana entre o revestimento epitelial e a cápsula. Por sua vez, foram considerados como hiperplásicos, os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células e interface arciforme entre a cápsula e o revestimento epitelial (APÊNDICE A).

### 3.8 Estudo imunoistoquímico

#### 3.8.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (*3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA*). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe Plus™, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA*), utilizando anticorpo policlonal anti-LC3A e anticorpos monoclonais anti-Atg7, anti-p62 e anti-p-mTOR (QUADRO 2).

**Quadro 2.** Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Atg7	ab52472	Abcam	1:750	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight

p62	ab56416	Abcam	1:600	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
LC3A	#4599	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:200	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>

Cortes histológicos de granuloma periapical foram utilizados como controle positivo para os anticorpos anti-Atg7 e anti-LC3A. Por sua vez, o controle positivo para o anticorpo anti-p62 foi realizado com cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória. Parênquima glandular salivar, presente em espécimes de fenômeno de extravasamento de muco, serviu como controle positivo para o anticorpo anti-p-mTOR. O controle negativo, por sua vez, constituiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 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)
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 2);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ 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);
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*EnVision™ Flex antibody diluent, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (QUADRO 2);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário conjugado com polímero de dextrano (*Ampliflier, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP conjugate, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ substrate system, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*) (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Harris, à temperatura ambiente (1,5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
  - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);
  - Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new, Merck KGaA, Darmstadt, DE*).

### 3.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado à microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), por uma examinadora previamente treinada.

A análise da expressão das proteínas Atg7, p62, LC3A e p-mTOR foi realizada no componente epitelial das lesões. Adaptando-se a metodologia empregada no estudo de Leonardi *et al.* (2013), os casos foram classificados, de acordo com o predomínio da imunorreatividade

para as proteínas avaliadas nas camadas epiteliais, em: imunomarcção em camada basal/parabasal, imunomarcção em camada parabasal/superficial, imunomarcção em camada superficial e imunomarcção em toda a extensão do revestimento.

Além disso, com base em uma adaptação da metodologia utilizada no estudo de Brito *et al.* (2018), foi realizada uma análise quantitativa da expressão das proteínas Atg7, p62, LC3A e p-mTOR, no epitélio dos COs, CDs e CRs. Foi avaliada a imunorreatividade, separadamente, em citoplasma e em núcleo. Sob aumento de 100×, foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos. Em sequência, sob aumento de 400×, dez campos do revestimento epitelial foram fotomicrografados (*ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*) e as imagens foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa *ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)*, foi realizada a contagem das células imunomarcadas e das células negativas em cada um dos campos microscópicos. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas.

### **3.9 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 Corp., Armonk, NY, USA*). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa maneira, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos de lesões e características histopatológicas dos CRs. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).



*Artigo*

---

## 4 ARTIGO

### 4.1 Apresentação

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo é apresentado nesta dissertação: **“Análise imunoistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia em cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos”**.

O referido artigo será submetido ao periódico *International Endodontic Journal* (ISSN: 1365-2591, Fator de impacto: 3.801, Qualis Odontologia: A1), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

## 4.2 Artigo a ser submetido

### **Análise imunoistoquímica de proteínas relacionadas à autofagia em cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos**

C. R. Ferreira<sup>1</sup>, F. C. D. Medeiros<sup>2</sup>, R. A. Mesquita<sup>3</sup>, P. M. Alves<sup>1</sup>, C. F. W. Nonaka<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Caicó, RN, Brasil.*

<sup>3</sup>*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.*

**Título breve:** Autofagia em cistos odontogênicos

**Palavras chaves:** Autofagia, cisto radicular, cisto dentígero, ceratocisto odontogênico, imunoistoquímica

#### **Autor correspondente:**

Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúnas, 351 – Bairro Universitário – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-500 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

**Abstract**

**Aim** To evaluate the immunoexpression of autophagy-related proteins (Atg7, LC3A, p62, and p-mTOR) in radicular cysts (RCs), dentigerous cysts (DCs) and odontogenic keratocysts (OKCs), and to correlate the findings with morphological parameters in RCs (intensity of the inflammatory infiltrate and pattern of the cystic epithelium).

**Methodology** Twenty RCs, 20 DCs, and 20 OKCs were submitted to immunohistochemistry. The percentages of cytoplasmic and nuclear staining for Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR in the epithelial component of the lesions were determined, as well as the predominance of immunoreactivity in the different epithelial layers. The results were analyzed statistically using the nonparametric Mann-Whitney test ( $P < 0.05$ ).

**Results** Cytoplasmic expression of Atg7 and p62 was found in all cases studied, with predominance of immunoreactivity in the basal/parabasal layer of OKCs and in all epithelial layers of RCs and DCs. Cytoplasmic expression of p-mTOR was observed in all OKCs and DCs, as well as in 50.0% of RCs, with predominance of immunoreactivity in the superficial layer for all groups. RCs and OKCs exhibited higher cytoplasmic expression of Atg7 compared to DCs, with statistical significance between the last two ( $P < 0.05$ ). Higher cytoplasmic expression of p62 was observed in RCs compared to OKCs and DCs ( $P < 0.05$ ). Regarding p-mTOR, there was higher cytoplasmic expression in OKCs compared to DCs and RCs ( $P < 0.05$ ). Analysis of nuclear expression of Atg7 revealed higher percentages of positivity in OKCs compared to DCs and RCs ( $P < 0.05$ ). In addition, RCs and OKCs presented higher nuclear expression of p62 compared to DCs ( $P < 0.05$ ). Regarding nuclear expression of LC3A and p-mTOR, all groups exhibited low median percentages of positivity. No significant differences in the immunoexpression of autophagy-related proteins were observed according to the morphological parameters of RCs ( $P > 0.05$ ).

**Conclusions** The results suggest the participation of autophagy in the pathogenesis of RCs, DCs and OKCs. Nevertheless, the immunoexpression of Atg7, LC3A, p62 and p-mTOR may not be related to the histopathological characteristics of RCs. Furthermore, the nuclear translocation of proteins Atg7 and p62 may contribute to the more aggressive biological behavior of OKCs.

## Introdução

Os cistos odontogênicos, caracterizados como cavidades patológicas revestidas por epitélio de natureza odontogênica, constituem um importante grupo de lesões que acometem a região bucomaxilofacial (Rivero *et al.* 2010, Kammer *et al.* 2020). Nesse grupo, que inclui lesões de origem inflamatória e de desenvolvimento, o cisto radicular (CR), o cisto dentígero (CD) e o ceratocisto odontogênico (CO) assumem posição de destaque por serem os mais prevalentes dos ossos gnáticos (Johnson *et al.* 2014, Kammer *et al.* 2020).

Apesar de constituírem os cistos odontogênicos mais frequentes, CRs, CDs e COs apresentam importantes diferenças em relação à patogênese e ao comportamento biológico (Gabdail *et al.* 2009, Kechik & Siar 2018). Nesse sentido, diversas investigações foram direcionadas à compreensão dos mecanismos responsáveis por tais diferenças, como a análise da expressão de moléculas envolvidas na degradação de peptídeos biologicamente ativos (Ali *et al.* 2019), na angiogênese (de Andrade Santos *et al.* 2011) e na hipóxia (da Costa *et al.* 2018), assim como na adesão célula-célula e no ciclo celular (Gabdail *et al.* 2009, Kechik & Siar 2018, Pinheiro *et al.* 2020). No entanto, esses processos permanecem incompletamente compreendidos.

Na patogênese de lesões císticas, como nas doenças policísticas renal e hepática, estudos têm sugerido uma importante participação da autofagia (Zhu *et al.* 2017, Masyuk *et al.* 2018). A autofagia é um mecanismo adaptativo, no qual as células degradam seus próprios componentes citoplasmáticos nos lisossomos e utilizam os produtos derivados desta degradação para sua sobrevivência (Ravikumar *et al.* 2010, Yin *et al.* 2016). A iniciação desse processo é mediado por uma família de proteínas relacionadas à autofagia (Atgs), com destaque para Atg5, Atg6, Atg7 e Atg12 (Yin *et al.* 2016). Dentre os membros dessa família, a Atg7 se apresenta como uma das principais responsáveis pela lipidação da cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3), um componente fundamental para a formação da membrana autofagossômica (Tanida *et al.* 2001, Antonucci *et al.* 2015). Até o momento, foram reconhecidas três isoformas da proteína LC3 em humanos, denominadas LC3A, LC3B e LC3C (Koukourakis *et al.* 2015, Frudd *et al.* 2018).

A proteína LC3 participa do sequestro da massa citosólica a ser degradada ligando-se à proteína p62, um receptor seletivo de carga que tem sido descrito como um potencial marcador de fluxo autofágico (Kirkin *et al.* 2009, Koukourakis *et al.* 2015). Outro componente importante da autofagia é a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), considerada a principal reguladora negativa deste processo. Como resultado da ativação da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt, a proteína mTOR fosforilada (p-mTOR) impedirá a

formação e ativação do complexo Atg17-Atg29-Atg31, essencial para o início da autofagia (Kamada *et al.* 2010, Laplante *et al.* 2012, Yin *et al.* 2016).

O envolvimento da autofagia na patogênese de cistos odontogênicos, incluindo CRs, CDs e COs, ainda não é totalmente compreendido. Os poucos artigos publicados com essa temática revelaram que esse sistema de degradação intracelular pode contribuir para o desenvolvimento dos cistos odontogênicos supracitados (Chaisuparat *et al.* 2013, Li *et al.* 2014, Zhong *et al.* 2015). Além disso, pesquisas sugerem uma possível participação da autofagia na regulação de outros processos celulares em cistos odontogênicos, incluindo CRs e COs, como apoptose, proliferação celular e hipóxia (Zhu *et al.* 2013, Li *et al.* 2014, Huang *et al.* 2018).

Desse modo, considerando a escassez de estudos que relacionem a autofagia à patogênese dos CRs, CDs e COs, o presente estudo pretende avaliar uma potencial participação das proteínas Atg7, p62, LC3A e p-mTOR no desenvolvimento destes cistos. Espera-se, com este trabalho, contribuir para um melhor entendimento das diferenças relacionadas à patogênese e ao comportamento biológico dessas lesões císticas odontogênicas.

## **Materiais e Métodos**

### **Espécimes**

Sessenta casos de cistos odontogênicos, incluindo 20 CRs, 20 CDs e 20 COs, obtidos no arquivo do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), foram selecionados para este estudo. O diagnóstico histopatológico das lesões foi confirmado, por um patologista oral experiente, de acordo com a quarta classificação dos cistos odontogênicos da Organização Mundial da Saúde (El-Naggar *et al.* 2017). Casos oriundos de biópsia incisional ou submetidos previamente à descompressão foram excluídos do estudo. Além disso, foram excluídos da amostra os casos de CO associados à síndrome de Gorlin-Goltz, assim como CDs e COs secundariamente inflamados. Para todos os casos de CR, CD e CO, informações relativas ao sexo, idade dos pacientes e localização anatômica das lesões foram obtidas a partir de fichas de requisição de biópsia. A caracterização clínica dos grupos é apresentada na Tabela 1. Este estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Parecer nº 4.245.830).

### **Análise morfológica**

Os casos de CR, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes histológicos com 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Posteriormente, sob microscopia de

luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), um patologista oral experiente realizou a análise histopatológica dos CRs.

Foram analisados a intensidade do infiltrado inflamatório na cápsula fibrosa e o padrão de revestimento epitelial dos CRs. A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada a partir da porção luminal em direção à periferia das lesões, considerando-se 1 campo microscópico, sob aumento de 200×. Os casos que apresentaram células inflamatórias restritas a um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I; as lesões com infiltrado inflamatório presente em até dois terços foram definidas como de grau II; e os espécimes que exibiram células inflamatórias em mais de dois terços foram categorizados como de grau III (Peixoto *et al.* 2012).

A análise do padrão do revestimento epitelial nos CRs foi realizada de acordo com o tipo predominante em cada caso. Dessa forma, foram classificados como atróficos os cistos que apresentaram o revestimento epitelial constituído por 2 a 10 camadas de células de espessura e exibiram interface plana entre o revestimento epitelial e a cápsula. Por sua vez, foram considerados como hiperplásicos, os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células e interface arciforme entre a cápsula e o revestimento epitelial (Moreira *et al.* 2000).

### **Imunoistoquímica**

A partir do material fixado em formol e embocado em parafina, cortes com 3µm de espessura foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano. Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Tabela 2). Subsequentemente, os cortes foram imergidos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Posteriormente, os cortes teciduais foram incubados com anticorpos primários anti-Atg7, anti-p62, anti-LC3A e anti-p-mTOR (Tabela 2), lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA*). A atividade da peroxidase foi visualizada através da imersão dos cortes em diaminobenzidina (*Liquid DAB+ substrate system, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), obtendo um produto de reação de coloração acastanhada. Por fim, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula. Cortes histológicos de granuloma periapical foram utilizados como controle positivo para os anticorpos anti-Atg7 e anti-LC3A. Por sua vez, o controle positivo para o anticorpo anti-p62 foi realizado com cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória. Parênquima glandular salivar, presente em

espécimes de fenômeno de extravasamento de muco, serviu como controle positivo para o anticorpo anti-p-mTOR. O controle negativo, por sua vez, consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

### **Análise imunoistoquímica**

Os cortes teciduais foram analisados por uma examinadora previamente treinada, sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*). A análise da expressão das proteínas Atg7, p62, LC3A e p-mTOR foi realizada no componente epitelial das lesões. Os casos foram classificados, de acordo com o predomínio da imunorreatividade nas camadas epiteliais para as proteínas avaliadas, em: imunomarcção em camada basal/parabasal, imunomarcção em camada parabasal/superficial, imunomarcção em camada superficial e imunomarcção em toda a extensão do revestimento (Leonardi *et al.* 2013).

Adicionalmente, foi realizada uma análise quantitativa da expressão das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, p62, LC3A e p-mTOR) no revestimento epitelial dos CRs, CDs, e COs, com base em uma adaptação da metodologia utilizada por Brito *et al.* (2018). A imunexpressão das proteínas foi analisada, separadamente, no citoplasma e no núcleo das células epiteliais. Para isso, foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos, sob aumento de 100×. Em seguida, sob aumento de 400×, dez campos do revestimento epitelial foram fotomicrografados (*ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*) e as imagens foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa *ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)*, foi realizada a contagem das células imunomarcadas e das células negativas em cada um dos campos microscópicos. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de células positivas em relação ao total de células epiteliais.

### **Análise estatística**

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; *IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com o estudo imunoistoquímico das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Desta maneira, foram realizadas comparações entre as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas em relação aos grupos de lesões e características



histopatológicas dos CRs por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

### **Análise morfológica**

A análise da intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs revelou 11 (55,0%) casos classificados em grau III, 7 (35,0%) casos em grau II e 2 (10,0%) casos em grau I. Por sua vez, a análise do revestimento epitelial revelou 12 (60,0%) casos de CR com epitélio hiperplásico e 8 (40,0%) casos com epitélio atrófico.

### **Análise imunoistoquímica**

#### *Imunoexpressão de Atg7*

Expressão citoplasmática de Atg7 foi constatada em todos os casos de CR, CD e CO analisados. Por sua vez, expressão nuclear dessa proteína foi identificada em todos os COs, bem como na maioria dos CRs (90,0%) e CDs (80,0%) (Fig. 1A – C). Na maioria dos CRs (75,0%) e CDs (85,0%), constatou-se predomínio de imunorreatividade em todas as camadas do revestimento epitelial. Por sua vez, na maioria dos COs (80,0%), houve predomínio de imunoexpressão de Atg7 em camada basal/parabasal (Tabela 3).

A análise dos percentuais de imunopositividade citoplasmática para Atg7 revelou maior mediana nos CRs, seguidos dos COs e CDs, com diferença estatisticamente significativa entre os últimos ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2A). Em relação aos percentuais de positividade nuclear, observou-se maior mediana nos COs quando comparados aos CDs e CRs ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2B). Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de imunopositividade nuclear para Atg7 entre CRs e CDs ( $P > 0,05$ ) (Fig. 2B).

Com relação às características histopatológicas dos CRs (padrão do revestimento epitelial e intensidade do infiltrado inflamatório), não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Atg7 ( $P > 0,05$ ) (Figs. 3 e 4).

#### *Imunoexpressão de LC3A*

Expressão citoplasmática de LC3A foi constatada na maioria dos CRs (70,0%), CDs (85,0%) e COs (65,0%) analisados. Com relação à imunoexpressão nuclear, constatou-se positividade na maioria dos CRs (70,0%) e CDs (70,0%), bem como em uma menor proporção dos COs (35,0%) (Fig. 5A – C). Foi observado predomínio de imunopositividade em camada

parabasal/superficial do epitélio em todos os casos de CO. Por sua vez, CRs e CDs revelaram considerável variabilidade no predomínio de imunorreatividade para LC3A nas camadas epiteliais (Tabela 3).

A análise dos percentuais de positividade citoplasmática para LC3A revelou maior mediana nos COs, seguidos dos CDs e CRs, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de lesões ( $P > 0,05$ ) (Fig. 2A). Em relação à imunopressão nuclear, CRs, CDs e COs apresentaram baixos percentuais medianos de positividade, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ ) (Fig. 2B).

Quanto ao padrão do revestimento epitelial e à intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopressão citoplasmática e nuclear de LC3A ( $P > 0,05$ ) (Figs. 3 e 4).

#### *Imunopressão de p62*

Expressão citoplasmática de p62 foi constatada em todos os casos de CRs, CDs e COs avaliados. Por sua vez, imunopressão nuclear dessa proteína foi observada na maioria dos CRs (95,0%) e CDs (95,0%), bem como em todos os COs (Fig. 6A – C). Na maioria dos CRs (89,4%) e em todos os CDs, observou-se predomínio de imunorreatividade para p62 em todas as camadas do epitélio. Na maioria dos COs (85,0%), foi constatado predomínio de imunopositividade em camada parabasal/superficial do epitélio (Tabela 3).

Foram constatados percentuais de positividade citoplasmática para p62 significativamente superiores nos CRs, quando comparados aos CDs e COs ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2A). Em relação à imunopressão nuclear, CDs exibiram menores percentuais medianos de positividade para p62 em comparação aos CRs ( $P < 0,05$ ) e COs ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2B).

Em relação às características histopatológicas dos CRs, não houve diferença estatisticamente significativa nos percentuais de imunopressão citoplasmática e nuclear de p62 ( $P > 0,05$ ) (Figs. 3 e 4).

#### *Imunopressão de p-mTOR*

Expressão citoplasmática para p-mTOR foi constatada em todos os CDs e COs, bem como em 50,0% dos CRs. Imunorreatividade nuclear, por outro lado, foi mais frequente nos CDs (70,0%), seguidos dos COs (55,0%) e CRs (25,0%) (Fig. 7A – C). Em todos os grupos, foi mais frequente o predomínio de imunorreatividade para p-mTOR em camada superficial do epitélio, com destaque para os COs (Tabela 3).

A análise dos percentuais de imunopositividade citoplasmática revelou maior mediana nos COs, seguidos dos CDs e CRs, com diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2A). Em relação à imunoexpressão nuclear, CRs, CDs e COs apresentaram baixos percentuais medianos de positividade. Comparados aos CDs e COs, os CRs apresentaram menores percentuais de positividade nuclear para p-mTOR ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2B).

Em relação ao padrão do revestimento epitelial e à intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunoexpressão citoplasmática e nuclear de p-mTOR ( $P > 0,05$ ) (Figs. 3 e 4).

## Discussão

A autofagia é um importante mecanismo adaptativo que participa de várias funções fisiológicas e de processos patológicos (Komatsu *et al.* 2006, Yin *et al.* 2016), mas seu envolvimento na patogênese dos cistos odontogênicos permanece incompletamente compreendido. Nesse contexto, os resultados da presente pesquisa sugerem uma importante participação das proteínas relacionadas à autofagia (Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR) no desenvolvimento de CRs, CDs e COs. Além disso, as diferenças no comportamento biológico desses cistos odontogênicos podem estar relacionadas a diferentes fluxos autofágicos nessas lesões.

Todos os CRs, CDs e COs analisados apresentaram expressão citoplasmática de Atg7, com predomínio de imunorreatividade em camada basal/parabasal nos COs e em todas as camadas do revestimento epitelial em CRs e CDs. Altos níveis de expressão citoplasmática de Atg7 sugerem ativação da autofagia, especialmente em virtude de sua participação na formação e fusão das membranas autofagossômicas (Komatsu *et al.* 2012, Yin *et al.* 2016). A análise dos percentuais de imunopositividade citoplasmática para Atg7 revelou maior mediana nos CRs, seguidos dos COs e CDs, sugerindo uma menor ativação da autofagia nos últimos. Estudos prévios descreveram alta expressão de proteínas relacionadas à autofagia em CRs (Zhu *et al.* 2013, Huang *et al.* 2018) e COs (Li *et al.* 2014).

Em relação à proteína LC3A, o presente estudo demonstrou imunorreatividade citoplasmática na maioria dos CRs, CDs e COs analisados. A análise dos percentuais de positividade citoplasmática para essa proteína relacionada à autofagia revelou maior mediana nos COs, seguidos dos CDs e CRs, sem diferenças significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Em consonância com esses achados, Li *et al.* (2014) observaram maior imunoexpressão de LC3 em COs quando comparados aos CRs.

No que concerne à expressão citoplasmática de p62, foram constatados percentuais de positividade significativamente superiores nos CRs, quando comparados aos CDs e COs ( $P < 0,05$ ). Em concordância com esses achados, pesquisas prévias relataram menor imunoposição de p62 em lesões com comportamento biológico mais agressivo (Okada *et al.* 2014, Huang *et al.* 2018). Por sua vez, Huang *et al.* (2018) observaram maior expressão citoplasmática de p62 em polpas dentárias quando comparadas aos CRs. A proteína p62 participa da autofagia, ligando-se ao material citoplasmático a ser degradado e subsequentemente unindo-se diretamente à proteína LC3 presente nas membranas internas dos autofagossomos (Kirkin *et al.* 2009, Komatsu *et al.* 2012).

Durante a autofagia, a proteína p62 é degradada juntamente com o material citoplasmático sequestrado (Kirkin *et al.* 2009, Komatsu *et al.* 2012, Jiang & Mizushima, 2015). Dessa forma, estudos sugerem que a imunomarcagem para essa proteína pode ser utilizada para analisar o fluxo autofágico (Komatsu *et al.* 2012, Jiang & Mizushima, 2015, Huang *et al.* 2018). Quando a autofagia está inativa, o nível intracelular de p62 é alto. Por outro lado, após o início desse processo catabólico, ocorre redução da concentração intracelular de p62 (Komatsu *et al.* 2012, Jiang & Mizushima, 2015).

Devido ao comportamento biológico mais agressivo e ao maior potencial de proliferação celular dos COs, a autofagia poderia atuar na disponibilização de nutrientes e energia para as células basais e parabasais. Nesse sentido, Sharp *et al.* (2019), ao avaliarem xenoinxertos de células epiteliais derivadas de ameloblastoma, observaram que invaginações epiteliais em direção ao tecido estromal eram fortemente imunorreativas a p62 e LC3, especialmente nas camadas epiteliais mais profundas. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a autofagia pode estar relacionada com o potencial de proliferação celular e o crescimento infiltrativo das células epiteliais mais próximas do mesenquima (Sharp *et al.* 2019).

A proteína p-mTOR inibe a formação e ativação do complexo Atg17-Atg29-Atg31, constituindo uma importante reguladora negativa da autofagia (Kamada *et al.* 2010, Laplante *et al.* 2012, Yin *et al.* 2016). No presente estudo, foi constatada imunopositividade citoplasmática para p-mTOR em todos os casos de CO e CD, além de 50,0% dos CRs. Em todos os grupos, foi mais frequente o predomínio de imunorreatividade para p-mTOR em camada superficial do epitélio, com destaque para os COs. Esses resultados, somados aos achados referentes às imunoposições de Atg7, LC3A e p62, sugerem uma potencial ativação da autofagia nas camadas mais profundas do revestimento epitelial dos CRs, CDs e COs.

Além disso, o predomínio de imunorreatividade para as proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR em diferentes camadas do revestimento dos CRs, CDs e COs pode sugerir a existência

de fluxos autofágicos distintos no epitélio dessas lesões. Essa sugestão é alicerçada pelos resultados observados em estudo sobre a autofagia na diferenciação epidérmica (Akinduro *et al.* 2016). De acordo com Akinduro *et al.* (2016), na epiderme podem existir diferentes fluxos autofágicos entre proteínas expressas na camada basal, como Beclina1 e Atg5-Atg12, e na camada granulosa, representados por LC3 e p62, os quais sofrem inibição por mTOR.

A análise dos percentuais de positividade citoplasmática para p-mTOR revelou maior mediana nos COs, seguidos dos CDs e CRs ( $P < 0,05$ ). Esses resultados poderiam sugerir uma maior inibição da autofagia nos COs. No entanto, CRs e CDs apresentaram maiores percentuais de células imunopositivas para p62, uma proteína cujos níveis intracelulares tendem a se mostrar aumentados quando a autofagia está inativa (Komatsu *et al.* 2012, Jiang & Mizushima, 2015). Tais achados, em conjunto, sugerem uma maior ativação da autofagia nos COs, o que poderia contribuir para o comportamento biológico mais agressivo dessas lesões em comparação aos CRs e CDs.

Estudos têm ressaltado a importância da degradação de componentes nucleares, por meio da nucleofagia, em processos fisiológicos e patológicos (Krick *et al.* 2009, Luo *et al.* 2016). As proteínas envolvidas na nucleofagia ainda não são totalmente conhecidas, mas pesquisas com linhagens celulares sugerem a participação de Atg3, Atg5, Atg7, LC3, Beclina-1 e p62 (Huang & Liu, 2015, Huang *et al.* 2015, Akinduro *et al.* 2016). No presente estudo, CRs, CDs e COs exibiram expressão nuclear de Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR, com percentuais de positividade variados. Em conjunto, esses achados sugerem um potencial envolvimento da nucleofagia na patogênese de CRs, CDs e COs, possivelmente contribuindo para o processo de modificação pós-transcricional do RNA e a manutenção da homeostase do DNA nuclear (Luo *et al.* 2016).

Ainda no contexto da expressão nuclear das proteínas relacionadas à autofagia, os resultados desta pesquisa revelaram maiores percentuais de positividade para Atg7 nos COs quando comparados aos CRs e CDs ( $P < 0,05$ ). Além disso, CRs e COs exibiram maior expressão nuclear de p62 em comparação aos CDs ( $P < 0,05$ ). As funções exatas de Atg7 em núcleo permanecem pouco compreendidas, mas estudos têm sugerido uma possível participação na lipidação de LC3 (Luo *et al.* 2016). Por sua vez, outras pesquisas ressaltam que a expressão nuclear de p62 pode estar relacionada a funções sem conexão com a nucleofagia, como o recrutamento de proteínas poliubiquinizadas e a degradação de proteínas danificadas (Havaki *et al.* 2017). Ainda nesse contexto, estudos revelam que altos níveis de expressão nuclear de p62 podem estar relacionados a alterações no reparo do DNA e à instabilidade genômica (Akinduro *et al.* 2016, Havaki *et al.* 2017). Em conjunto, os achados anteriormente descritos e os resultados da presente pesquisa sugerem que p62 pode contribuir para a

patogênese de CRs e COs, por mecanismos não relacionados à nucleofagia. Além disso, a translocação nuclear das proteínas Atg7 e p62 pode contribuir para o comportamento biológico mais agressivo dos COs.

Estudos têm sugerido que a intensidade do infiltrado inflamatório pode influenciar o padrão do revestimento epitelial (hiperplásico ou atrófico) nos CRs (Moreira *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2001). Este último, por sua vez, representaria um parâmetro morfológico capaz de indicar atividade/ inatividade de crescimento nessas lesões (Moreira *et al.* 2000). Com base nessas sugestões e no envolvimento da autofagia em processos imunoinflamatórios (Luo *et al.* 2016), na presente pesquisa, esperava-se identificar diferenças na expressão de Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com o padrão do revestimento epitelial e a intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs. No entanto, os resultados deste estudo sugerem ausência de relação entre essas características histopatológicas dos CRs e a expressão dessas proteínas relacionadas à autofagia.

### **Conclusão**

Os resultados deste estudo sugerem a participação da autofagia na patogênese dos CRs, CDs e COs. A imunoexpressão das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR, no entanto, pode não estar relacionada às características histopatológicas dos CRs. Além disso, a translocação nuclear das proteínas Atg7 e p62 pode contribuir para o comportamento biológico mais agressivo dos COs.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

### **Referências**

Akinduro O, Sully K, Patel A et al. (2016) Constitutive autophagy and nucleophagy during epidermal differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* **136**, 1460-70.

- Ali A, Asif M, Ahmad B *et al.* (2019) Stromal expression of CD10 by immunohistochemistry in odontogenic keratocyst (OKC), dentigerous and radicular cysts and its correlation with local recurrence and aggressive behavior. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **20**, 249-53.
- Antonucci L, Fagman JB, Kim JY *et al.* (2015) Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E6166-74.
- Brito LNS, Almeida, MMRL, Souza LB *et al.* (2018) Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *Journal of Endodontics* **44**, 728-33.
- Chaisuparat R, Yodsanga S, Montaner S, Jham BC (2013) Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and ameloblastomas. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology and Oral Radiology* **116**, 336-42.
- da Costa NMM, Siqueira AS, Ribeiro ALR *et al.* (2018) Role of HIF-1 $\alpha$  and CASPASE-3 in cystogenesis of odontogenic cysts and tumors. *Clinical Oral Investigations* **22**, 141-9.
- de Andrade Santos PP, Aquino ARLA, Barreto AO *et al.* (2011) Immunohistochemical expression of nuclear factor  $\kappa$ B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **112**, 476-83.
- El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (2017) *WHO classification of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press.
- Frudd K, Burgoyne T, Burgoyne JR (2018) Oxidation of Atg3 and Atg7 mediates inhibition of autophagy. *Nature Communications* **9**, 1-15.
- Gadbail AR, Chaudhary M, Patil S, Gawande, M (2009) Actual proliferating index and p53 protein expression as prognostic marker in odontogenic cysts. *Oral Diseases* **15**, 490-8.
- Havaki S, Vlachou V, Zampetidis CP *et al.* (2017) Monitoring autophagy immunohistochemically and ultrastructurally during human head and neck carcinogenesis. Relationship with the DNA damage response pathway. *International Journal Molecular Science* **18**, E1920.
- Huang HY, Wang WC, Lin PY *et al.* (2018) The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions. *International Endodontic Journal* **51**, 125-45.
- Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD (2014) Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* **5**, 9-14.
- Jiang P, Mizushima N (2015) LC3-and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods* **75**, 13-8.

- Kamada Y, Yoshino KI, Kondo C (2010) Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 1049-58.
- Kammer PV, Mello FW, Rivero ERC (2020) Comparative analysis between developmental and inflammatory odontogenic cysts: retrospective study and literature review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **24**, 73-84.
- Kechik KA, Siar CH (2018) Spatial distribution of osteopontin, CD44v6 and podoplanin in the lining epithelium of odontogenic keratocyst, and their biological relevance. *Annals of Diagnostic Pathology* **32**, 17-22.
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular Cell* **34**, 259-69.
- Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A *et al.* (2015) Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. *PloS One* **10**, e0137675.
- Komatsu M, Kominami E, Tanaka K (2006) Autophagy and neurodegeneration. *Autophagy* **2**, 315-17, 2006.
- Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y (2012) p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacological Research* **66**, 457-62.
- Krick R, Mühe Y, Prick T *et al.* (2009) Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits. *Autophagy* **5**, 270-2.
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-93.
- Leonardi R, Matthews JB, Loreto C *et al.* (2013) Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *Histology and Histopathology* **28**, 1175-84.
- Li RF, Chen G, Zhao Y, Zhao YF, Liu B (2014) Increased expression of autophagy-related proteins in keratocystic odontogenic tumours: its possible association with growth potential. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **52**, 551-6.
- Luo M, Zhao X, Song Y, Cheng H, Zhou RM *et al.* (2016) Nuclear autophagy: an evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. *Autophagy* **12**, 1973-83.
- Masyuk AI, Masyuk TV, Pisarello MJL *et al.* (2018) Cholangiocyte autophagy contributes to hepatic cystogenesis in polycystic liver disease and represents a potential therapeutic target. *Hepatology* **67**, 1088-108.



- Moreira PR, Santos DF, Martins RD, Gomez RS (2000) CD57+ cells in radicular cyst. *International Endodontic Journal* **33**, 99-102.
- Pinheiro JC, de Carvalho CHP, Galvão HC *et al.* (2020) Relationship between mast cells and E-cadherin in odontogenic keratocysts and radicular cysts. *Clinical Oral Investigations* **24**, 181-91.
- Peixoto RF, Pereira JS, Nonaka CFW, Silveira EJD, Miguel MCC (2012) Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Archives of Oral Biology* **57**, 1159-64.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE *et al.* (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* **90**, 1383-435.
- Rivero ERT, Grando LJ, Menegat F, Claus JDP, Xavier FM (2011) Cell block technique as a complementary method in the clinical diagnosis of cyst-like lesions of the jaw. *Journal of Applied Oral Science* **19**, 269-73.
- Sharp RC, Effiom OA, Dhingra A *et al.* (2019) Enhanced basal autophagy supports ameloblastoma-derived cell survival and reactivation. *Archives of Oral Biology* **98**, 61-7.
- Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K *et al.* (2001) Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions – correlation with inflammatory cells and epithelial cells. *Oral Diseases* **7**, 336-43.
- Tanida I, Miyake ET, Ueno T, Kominami E (2001) The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 1701-1706.
- Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ (2016) Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell* **3**, 588-96.
- Zhu L, Yang J, Zhang J, Peng B (2013) The presence of autophagy in human periapical lesions. *Journal of Endodontics* **39**, 1379-84.
- Zhong WQ, Chen G, Zhang W *et al.* (2015) Down-regulation of connexin43 and connexin32 in keratocystic odontogenic tumours: potential association with clinical features. *Histopathology* **66**, 798-807.

**Tabela 1.** Distribuição dos casos de CR, CD e CO de acordo com os dados clínicos.

<b>Dados clínicos</b>	<b>CR</b>	<b>CD</b>	<b>CO</b>
<i>Idade (em anos)</i>			
Variação	6 – 75	13 – 74	8 – 69
Média ± desvio padrão	36,0 ± 17,5	31,4 ± 17,2	40,6 ± 20,9
<i>Sexo</i>			
Feminino	14 (70,0%)	14 (70,0%)	14 (70,0%)
Masculino	6 (30,0%)	6 (30,0%)	6 (30,0%)
<i>Localização anatômica</i>			
Maxila	15 (75,0%)	8 (40,0%)	5 (25,0%)
Mandíbula	5 (25,0%)	12 (60,0%)	15 (75,0%)

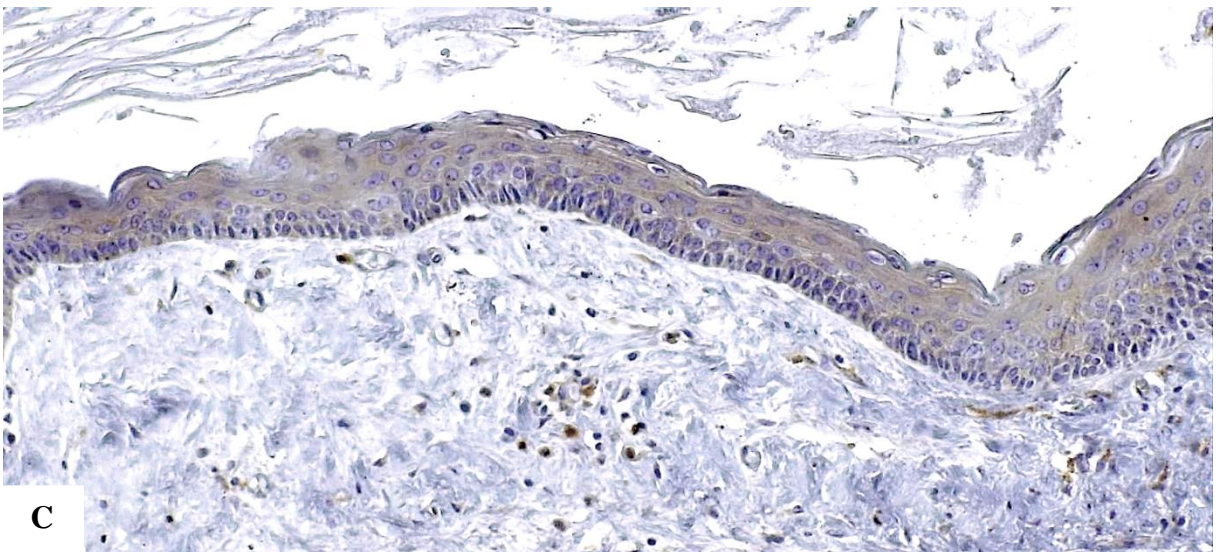
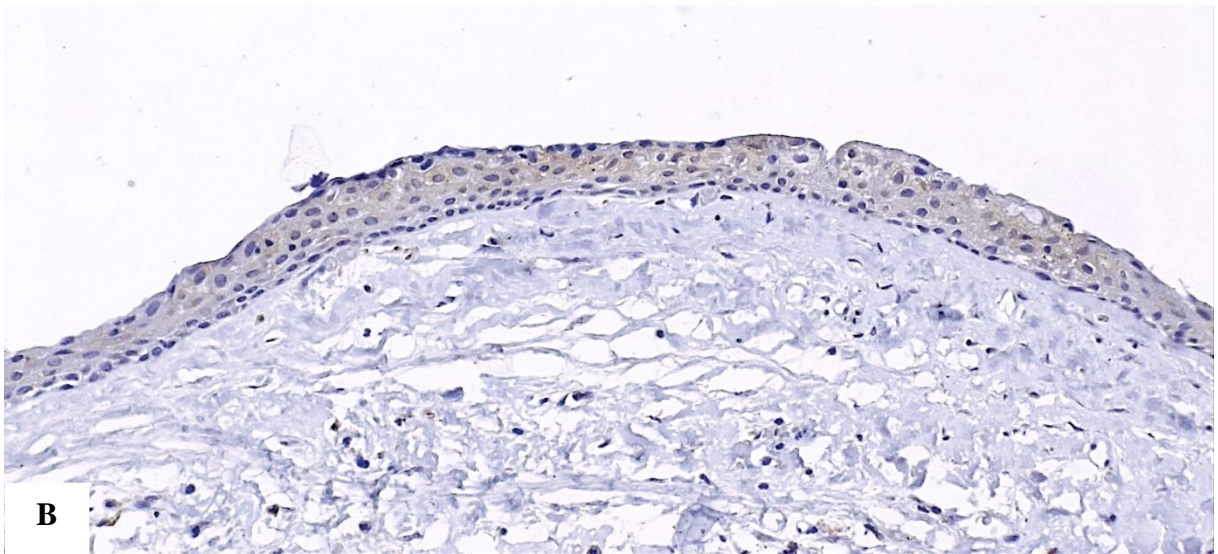
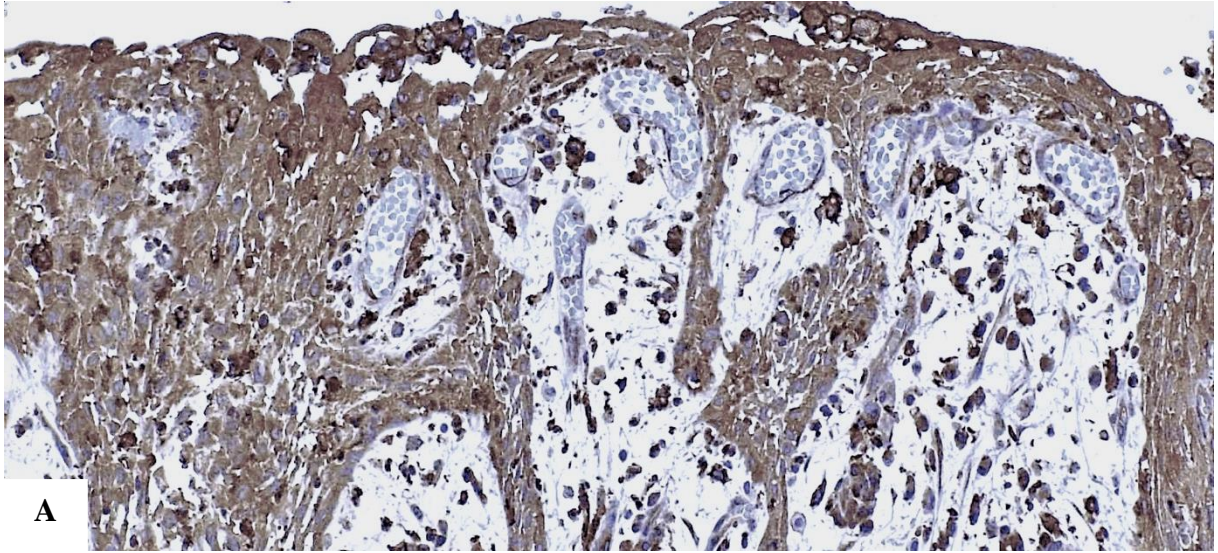
**Tabela 2.** Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.

<b>Especificidade</b>	<b>Referência</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Incubação</b>
Atg7	ab52472	Abcam	1:750	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
LC3A	#4599	Cell Signaling	1:500	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p62	ab56416	Abcam	1:600	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
p-mTOR	#2976	Cell Signaling	1:200	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>

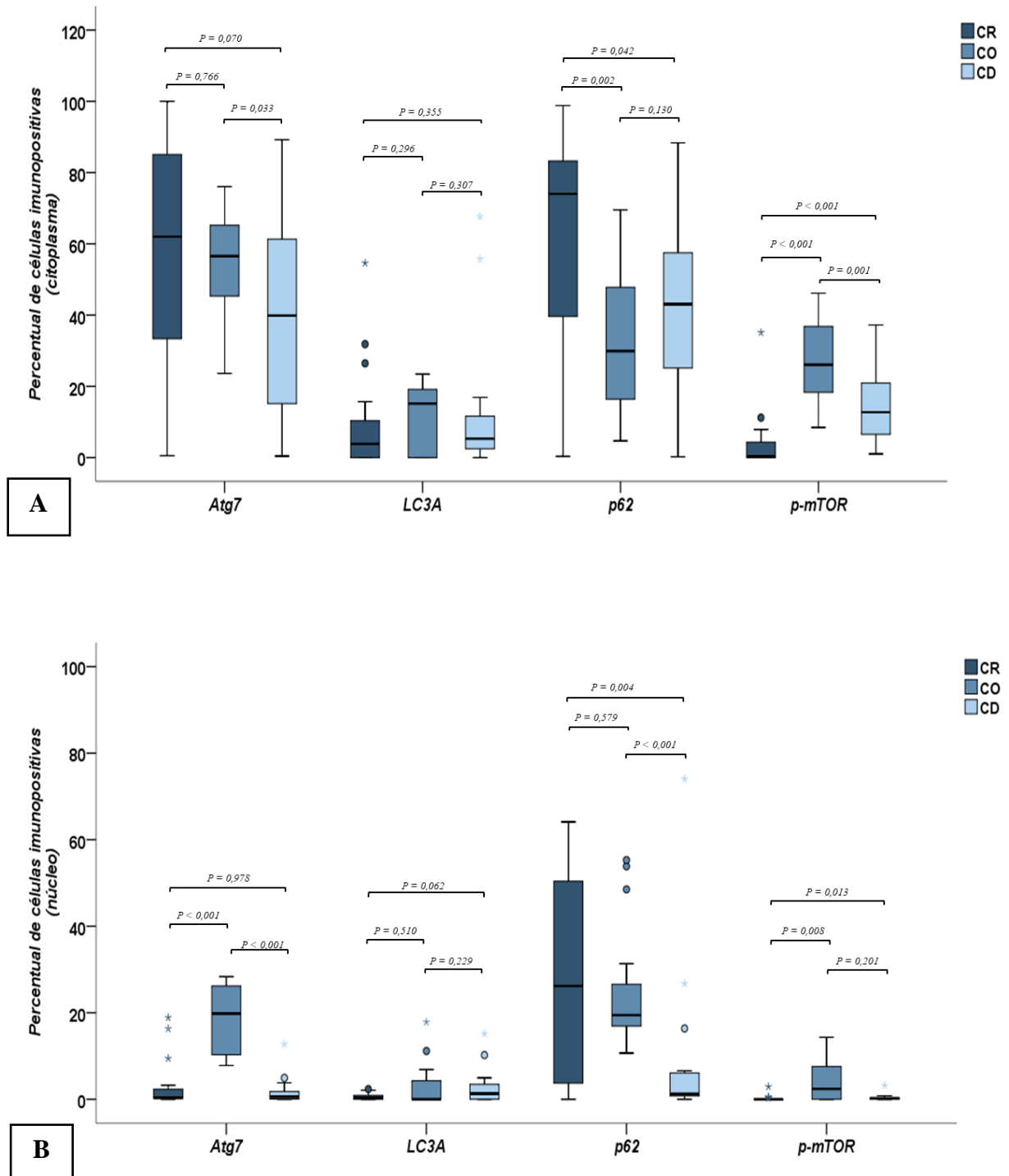
**Tabela 3.** Distribuição dos casos de CR, CD e CO de acordo com grupos e o predomínio da imunorreatividade para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR no tecido epitelial.

Proteínas/ predomínio	Grupos		
	CR	CD	CO
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Atg7</i>			
Basal/parabasal	1 (5,0)	2 (10,0)	16 (80,0)
Parabasal/superficial	3 (15,0)	1 (5,0)	0 (0,0)
Superficial	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Todas as camadas	15 (75,0)	17 (85,0)	4 (20,0)
<i>LC3A</i>			
Basal/parabasal	5 (35,7)	2 (11,7)	0 (0,0)
Parabasal/superficial	1 (7,1)	4 (23,4)	13 (100,0)
Superficial	4 (28,6)	6 (35,5)	0 (0,0)
Todas as camadas	4 (28,6)	5 (29,4)	0 (0,0)
<i>p62</i>			
Basal/parabasal	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Parabasal/superficial	1 (5,3)	0 (0,0)	17 (85,0)
Superficial	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Todas as camadas	17 (89,4)	20 (100,0)	3 (15,0)
<i>p-mTOR</i>			
Basal/parabasal	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (10,0)
Parabasal/superficial	4 (40,0)	9 (45,0)	4 (20,0)
Superficial	5 (50,0)	10 (50,0)	14 (70,0)
Todas as camadas	1 (10,0)	1 (5,0)	0 (0,0)

**Figura 1.** Expressão de Atg7 no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×).

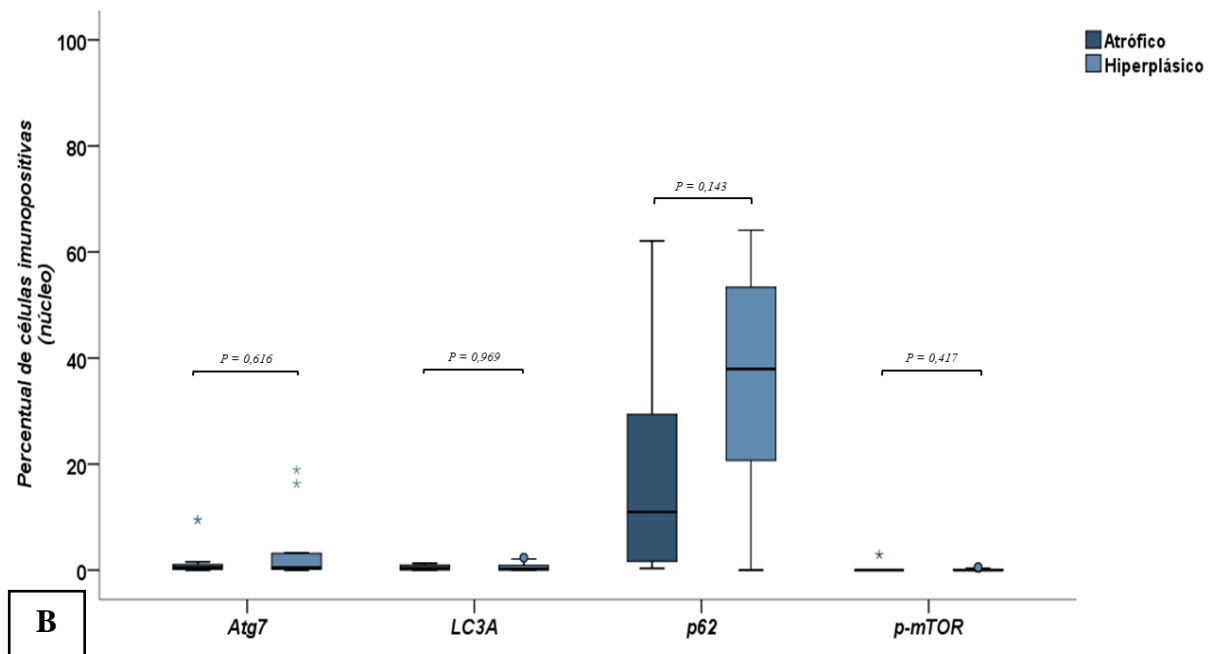
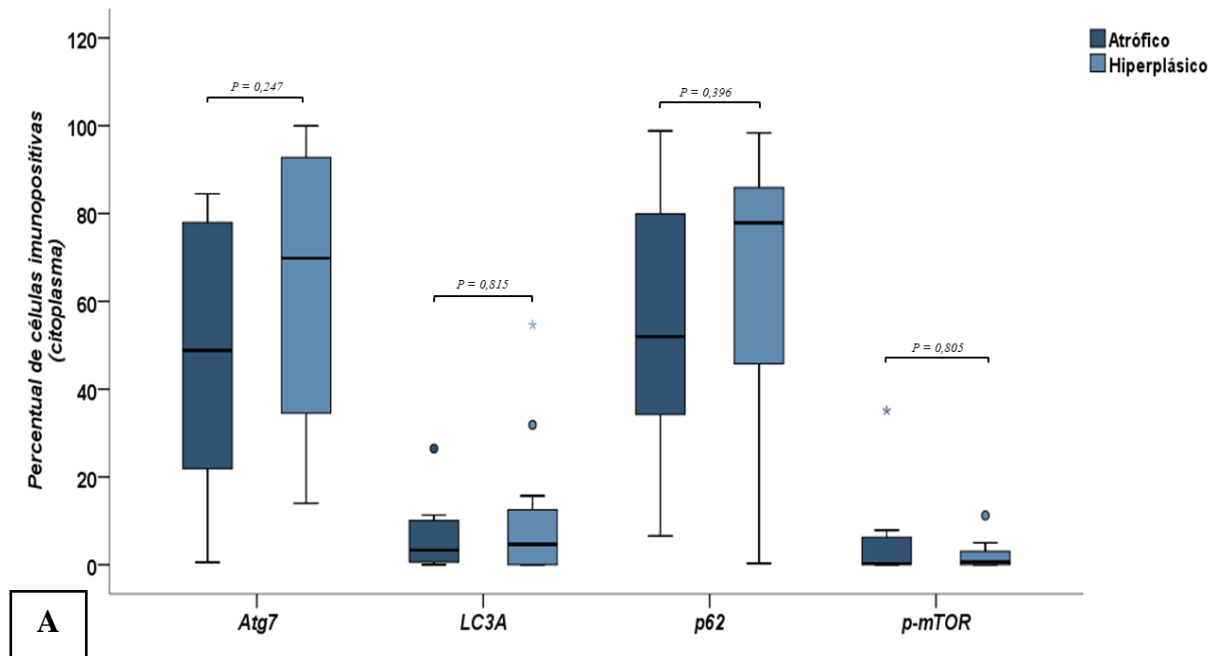


**Figura 2.** Boxplots relativos aos percentuais de células imunopositivas (citoplasma [A] e núcleo [B]) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR no revestimento epitelial de CRs, COs e COs.

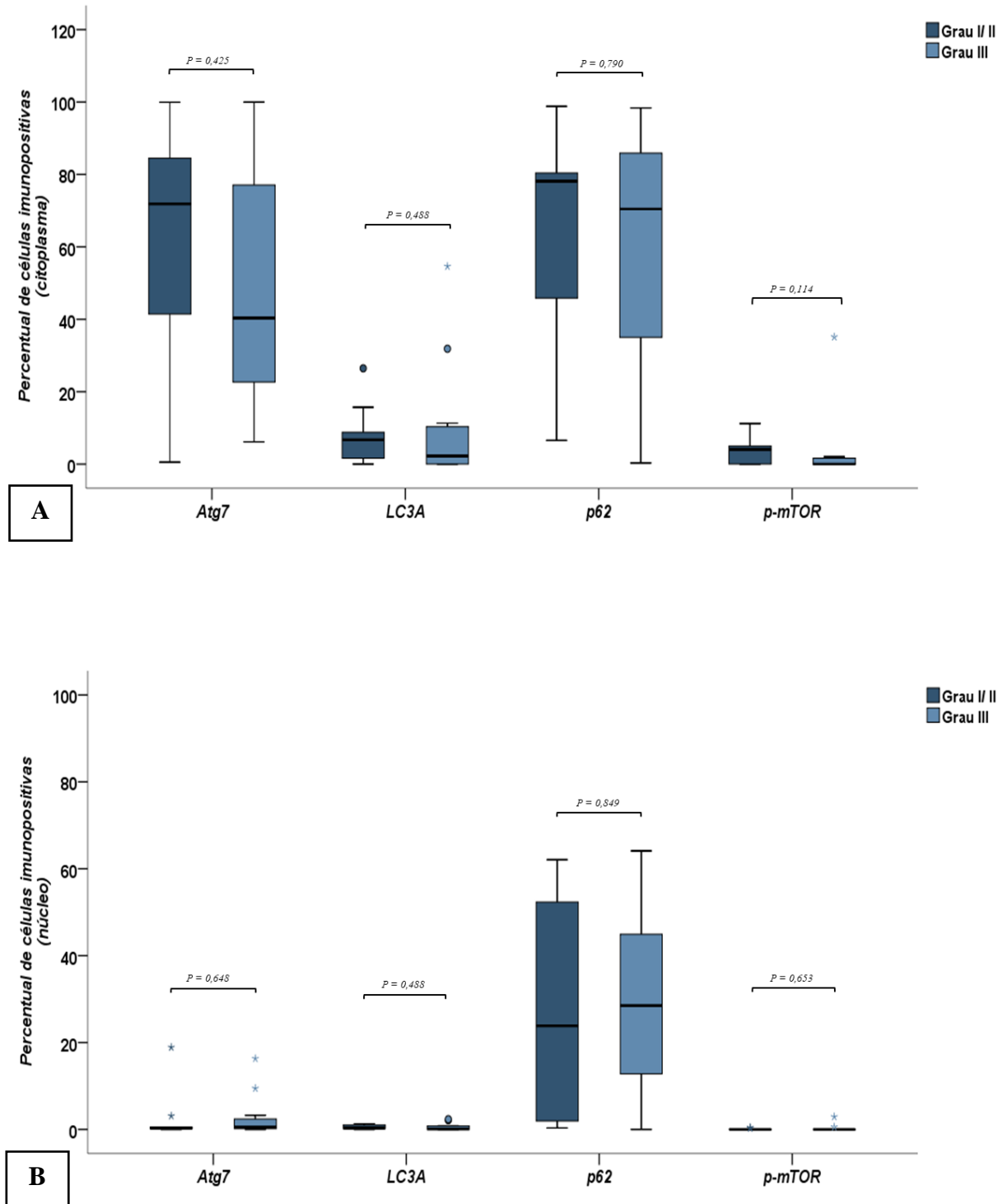




**Figura 3.** Boxplots ilustrando os percentuais de células imunopositivas (citoplasma [A] e núcleo [B]) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com o padrão do revestimento epitelial dos CRs.

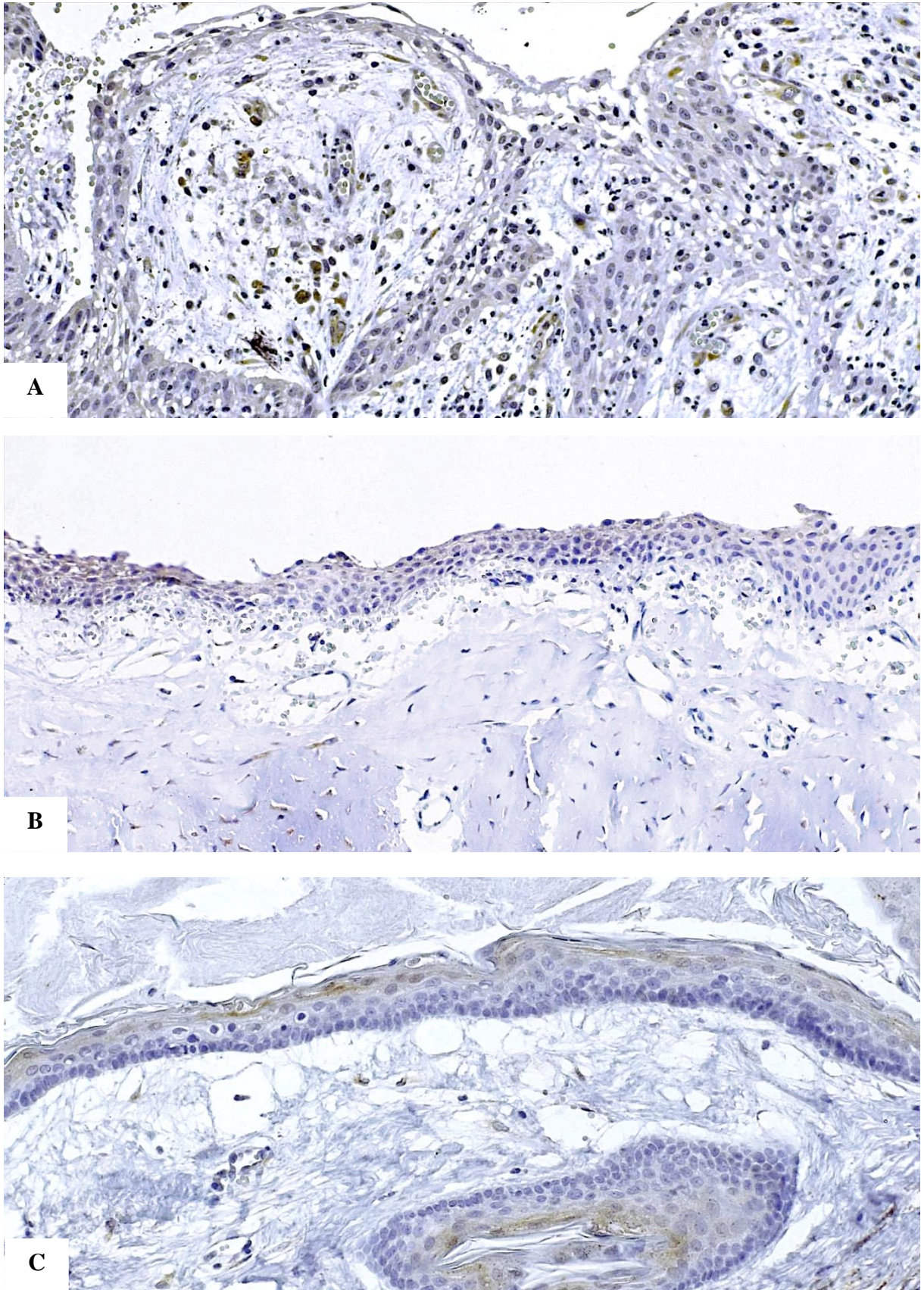


**Figura 4.** Boxplots ilustrando os percentuais de células imunopositivas (citoplasma [A] e núcleo [B]) para Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs.



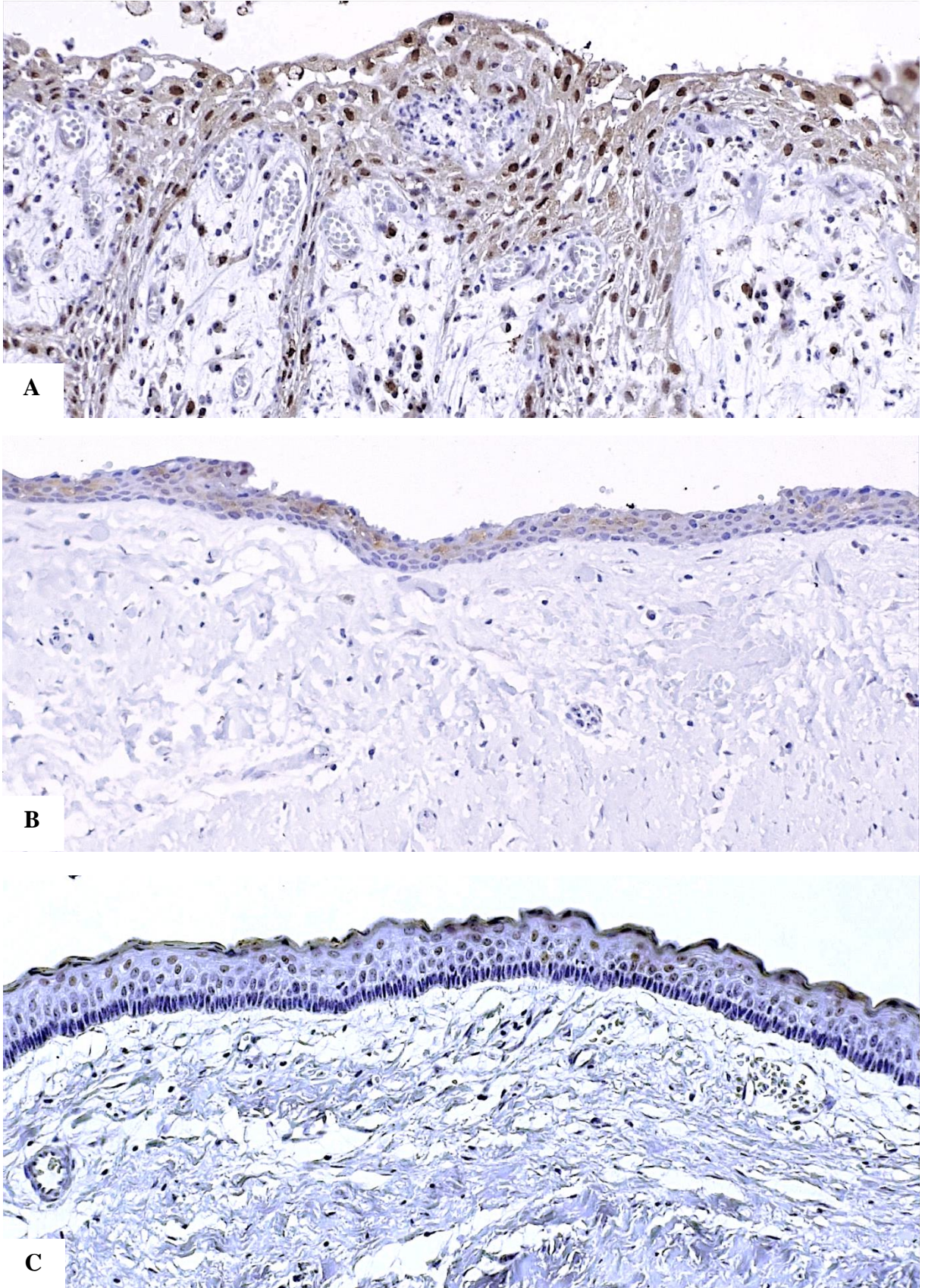


**Figura 5.** Expressão de LC3A no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×).



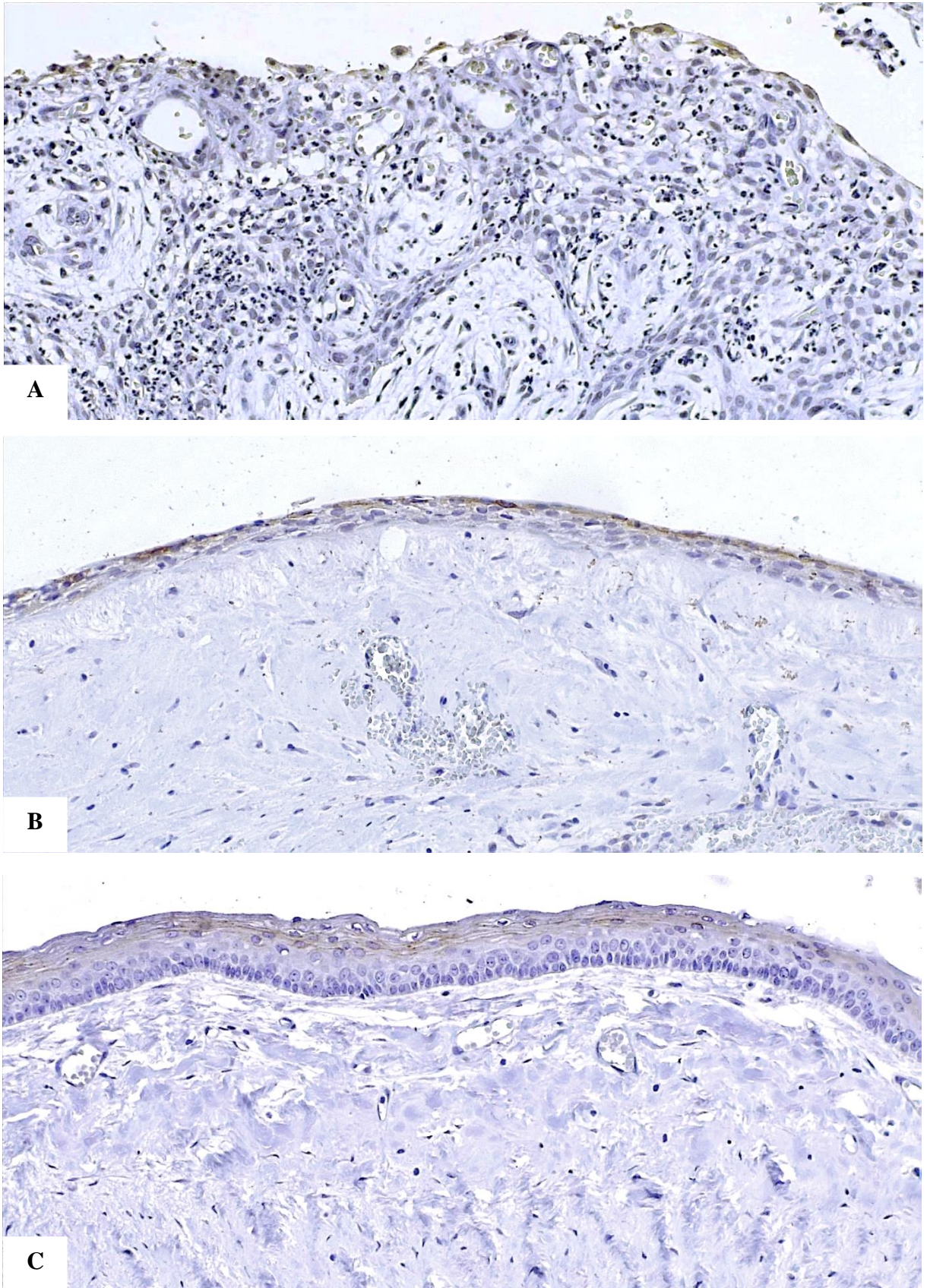


**Figura 6.** Expressão de p62 no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×).





**Figura 7.** Expressão de p-mTOR no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, 200×).



## *Considerações finais*

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No contexto das lesões císticas odontogênicas, CRs, CDs e COs se destacam por serem os mais prevalentes. Embora constituam importantes objetos de pesquisa, diversos aspectos relacionados à patogênese e ao comportamento biológico desses cistos ainda não são completamente compreendidos.

Os resultados deste estudo sugerem uma potencial participação da autofagia na patogênese dos CRs, CDs e COs. Em particular, as diferenças no comportamento biológico desses cistos odontogênicos podem estar relacionadas a diferentes fluxos autofágicos nessas lesões. Nesse contexto, é possível que a translocação nuclear das proteínas Atg7 e p62 contribua para o comportamento biológico mais agressivo dos COs. Por outro lado, a imunexpressão das proteínas Atg7, LC3A, p62 e p-mTOR pode não estar relacionada às características histopatológicas dos CRs.

Em conjunto, os achados desta pesquisa enaltecem a importância de novas investigações para uma melhor compreensão do papel dessas proteínas e da autofagia na patogênese dos cistos odontogênicos, fornecendo subsídios para a identificação de novos alvos terapêuticos.

## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- AKINDURO, O., *et al.* Constitutive autophagy and nucleophagy during epidermal differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 7, p. 1460-70, 2016.
- ALI, A., *et al.* Stromal expression of CD10 by immunohistochemistry in odontogenic keratocyst (OKC), dentigerous and radicular cysts and its correlation with local recurrence and aggressive behavior. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 1, p. 249-53, 2019.
- ALSAEGH, M. A., *et al.* Odontogenic epithelial proliferation is correlated with COX-2 expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 1, p. 247-53, 2017.
- ÁLVARES, P. R., *et al.* Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha in periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 12, p. 1783-7, 2018.
- ANTONUCCI, L., *et al.* Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 45, p. E6166-74, 2015.
- APPUHAMY, J. A., *et al.* Hanigan effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 419-29, 2014.
- BARRETO, D. C., *et al.* PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1418-22, 2000.
- BELLO, I. O. Keratocystic odontogenic tumor: A biopsy service's experience with 104 solitary, multiple and recurrent lesions. **Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal**, v. 21, n. 5, p. e538, 2016.
- BILODEAU, E. A.; COLLINS, B. M. Odontogenic cysts and neoplasms. **Surgical Pathology Clinics**, v. 10, n. 1, p. 177-222, 2017.
- BINNIE, W. H. Periodontal cysts and epulides. **Periodontology 2000**, v. 21, n. 1, p. 16-32, 1999.
- BORGHESI, A., *et al.* Odontogenic keratocyst: imaging features of a benign lesion with an aggressive behavior. **Insights Into Imaging**, v. 9, n. 5, p. 883-97, 2018.
- BRITO, L. N. S., *et al.* Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 5, p. 728-33, 2018.

---

<sup>1</sup> Conforme ABNT NBR 6023:2018

- BUYUKKURT, M. C.; OMEZLI, M. M.; MILOGLU, O. Dentigerous cyst associated with an ectopic tooth in the maxillary sinus: a report of 3 cases and review of the literature. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 109, n. 1, p. 67-71, 2010.
- CHAISUPARAT, R., *et al.* Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and ameloblastomas. **Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 3, p. 336-42, 2013.
- CHEN, J. H., *et al.* Clinicopathological analysis of 232 radicular cysts of the jawbone in a population of southern Taiwanese patients. **Kaoshiung Journal of Medical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 249-54. 2018.
- CHOU, L. F., *et al.* Effect of trehalose supplementation on autophagy and cystogenesis in a mouse model of polycystic kidney disease. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 42, 2018.
- DA COSTA, N. M. M., *et al.* Role of HIF-1 $\alpha$  and CASPASE-3 in cystogenesis of odontogenic cysts and tumors. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 1, p. 141-9, 2018.
- DALBY, K., *et al.* Targeting the pro-death and pro-survival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**, v. 6, n. 3, p. 322-29, 2010.
- DALEY, T. D.; WYSOCKI, G. P. The small dentigerous cyst: a diagnostic dilemma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 79, n. 1, p. 77-81, 1995.
- DE ANDRADE SANTOS, P. P., *et al.* Immunohistochemical expression of nuclear factor  $\kappa$ B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 112, n. 4, p. 476-83, 2011.
- DE BRITO MONTEIRO, B. V., *et al.* Participation of hMLH1, p63, and MDM2 proteins in the pathogenesis of syndromic and nonsyndromic keratocystic odontogenic tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 120, n. 1, p. 52-7, 2015.
- DE PONTES SANTOS, H. B., *et al.* Hyaline ring granulomas in a dentigerous cyst. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 26, n. 4, p. 1434-5, 2015.
- DE PONTES SANTOS, H. B., *et al.* Immunoexpression of DNA base excision repair and nucleotide excision repair proteins in ameloblastomas, syndromic and non-syndromic odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. **Archives of Oral Biology**, v. 110, p. 104627, 2020.
- DE CASTRO, M. S., *et al.* Conservative surgical treatments for nonsyndromic odontogenic keratocysts: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 5, p. 2089-101, 2018.
- EL-NAGGAR, A. K. *et al.* WHO classification of head and neck tumours. **IARC Press**, 4 ed, 2017, p. 343.



FINKELSTEIN, M. W., *et al.* Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective analysis of genetic, immunohistochemical and therapeutic features. Proposal of a multicenter clinical survey tool. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 1, p. 75-83, 2013.

FRUDD, K.; BURGOYNE, T.; BURGOYNE, J. R. Oxidation of Atg3 and Atg7 mediates inhibition of autophagy. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2018.

GABDAIL, A. R., *et al.* Actual proliferating index and p53 protein expression as prognostic marker in odontogenic cysts. **Oral Diseases**, v. 15, n. 7, p. 490-8, 2009.

GERVASIO, A. M., *et al.* Levels of GM-CSF, IL-3, IL-6 in fluid and tissue from human radicular cysts. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 1, p. 64-8, 2002.

HEIKINHEIMO, K., *et al.* Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 1, p. 101-11, 2015.

HAVAKI, S., *et al.* Monitoring autophagy immunohistochemically and ultrastructurally during human head and neck carcinogenesis. Relationship with the DNA damage response pathway. **International Journal Molecular Science**, v. 18, pii: E1920, 2017.

HUANG, H. Y., *et al.* The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 2, p. 125-45, 2018.

HYOMOTO, M., *et al.* Clinical conditions for eruption of maxillary canines and mandibular premolars associated with dentigerous cysts. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 124, n. 5, p. 515-20, 2003.

JAAFARI-ASHKAVAND, Z.; MEHRANMEHR, F.; ROOSTA, E. MCM3 and Ki67 proliferation markers in odontogenic cysts and ameloblastoma. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 9, n. 1, p. 47-50, 2019.

JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. LC3-and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. **Methods**, v. 75, p. 13-18, 2015.

JOHNSON, N. R., *et al.* Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 9-14, 2014.

JOHANSEN, T.; LAMARK, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. **Autophagy**, v. 7, n. 3, p. 279-96, 2011.

JONES, A. V.; CRAIG, G. T.; FRANKLIN, C. D. Range and demographics of odontogenic cysts diagnosed in a UK population over a 30-year period. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 35, n. 8, p. 500-7, 2006.

KACZMARZYK, T., *et al.* Investigation of clinicopathological parameters and expression of COX-2, bcl-2, PCNA, and p53 in primary and recurrent sporadic odontogenic keratocysts. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 9, p. 3097-106, 2018.

KAMADA, Y., *et al.* Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 4, p. 1049-58, 2010.

KAMMER, P. V.; MELLO, F. W.; RIVERO, E. R. C. Comparative analysis between developmental and inflammatory odontogenic cysts: retrospective study and literature review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 24, n. 1, p. 73-84, 2020.

KECHIK, K. A.; SIAR, C. H. Spatial distribution of osteopontin, CD44v6 and podoplanin in the lining epithelium of odontogenic keratocyst, and their biological relevance. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 32, p. 17-22, 2018.

KIRKIN, V., *et al.* A role for ubiquitin in selective autophagy. **Molecular Cell**, v. 34, n. 3, p. 259-69, 2009.

KOMATSU, M.; KAGEYAMA, S.; ICHIMURA, Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 6, p. 457-62, 2012.

KOMATSU, M.; KOMINAMI, E.; TANAKA, K. Autophagy and neurodegeneration. **Autophagy**, v. 2, n. 4, p. 315-17, 2006.

KOUKOURAKIS, M. I., *et al.* Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. e0137675, 2015.

KRICK, R., *et al.* Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits. **Autophagy**, v. 5, n. 2, p. 270-2, 2009.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-93, 2012.

LEITE, R. B., *et al.* Analysis of GLUT-1, GLUT-3, and angiogenic index in syndromic and non-syndromic keratocystic odontogenic tumors. **Brazilian Oral Research**, v. 31, p. e34, 2017.

LEONARDI, R., *et al.* Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. **Histology and Histopathology**, v. 28, n. 9, p. 1175-84, 2013.

LEUNG, Y. Y., *et al.* Results of the treatment of keratocystic odontogenic tumours using enucleation and treatment of the residual bony defect with Carnoy's solution. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45; n. 9, p. 1154-8, 2016.

LI, R. F., *et al.* Increased expression of autophagy-related proteins in keratocystic odontogenic tumours: its possible association with growth potential. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 52, n. 6, p. 551-6, 2014.

LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 7, p. 464-71, 2003.

- LIN, H. P., *et al.* Clinicopathological study of 252 jaw bone periapical lesions from a private pathology laboratory. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 109, n. 11, p. 810-8, 2010.
- LIN, L. M.; HUANG, G. T.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 908-16, 2007.
- LUCENA, A.O.A. **Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos.** Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2020.
- LUO, M., *et al.* Nuclear autophagy: an evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. **Autophagy**, v. 12, n. 11, p. 1973-83, 2016.
- MASYUK, A. I., *et al.* Cholangiocyte autophagy contributes to hepatic cystogenesis in polycystic liver disease and represents a potential therapeutic target. **Hepatology**, v. 67, n. 3, p. 1088-108, 2018.
- MEDEIROS, F. C. D. **Imunoexpressão de proteínas relacionadas a autofagia (Atg7, p62 e p-mTOR) em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin.** Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.
- MOREIRA, P. R.; SANTOS, D. F.; MARTINS, R. D.; GOMEZ, R. S. CD57+ cells in radicular cyst. **International Endodontic Journal**, v. 33, n. 2, p. 99-102, 2000.
- MUZIO, L. L., *et al.* Cystic lesions of the jaws: a retrospective clinicopathologic study of 2030 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 124, n. 2, p. 128-38, 2017.
- NAIR, P. N. New perspectives on radicular cysts: do they heal? **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 3, p. 155-60, 1998.
- NAIR, P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 15, n. 6, p. 348-81, 2004.
- NAIR, U., *et al.* A role for Atg8–PE deconjugation in autophagosome biogenesis. **Autophagy**, v. 8, n. 5, p. 780-93, 2012.
- NATH, S., *et al.* Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 415-24, 2014.
- NIMMANAGOTI, R., *et al.* Protein 53, B-cell lymphoma-2, cyclooxygenase-2, and CD105 reactivity in keratocystic odontogenic tumors: an immunohistochemical analysis. **International Journal of Applied & Basic Medical Research**, v. 9, n. 1, p. 27-31, 2019.

- NODA, A., *et al.* A bilocular radicular cyst in the mandible with tooth structure components inside. **Case Reports in Dentistry**. v. 2019, 2019.
- OKADA, M., *et al.* Immunohistochemical assessment of ATG7, LC3, and p62 in ameloblastomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 8, p. 606-12, 2014.
- PEIXOTO, R. F., *et al.* Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 9, p. 1159-64, 2012.
- PITAK-ARNNOP, P., *et al.* Management of odontogenic keratocysts of the jaws: a ten-year experience with 120 consecutive lesions. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 38, n. 5, p. 358-64, 2010.
- PHILIPSEN, H. P. Om keratocyster (Kolesteaomer) I kaeberne. **Tandlaegebladet**, v. 60, p. 963-80, 1956.
- QU, X., *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1809-20, 2003.
- RAVIKUMAR, B., *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1383-435, 2010.
- RIBEIRO JUNIOR, O., *et al.* Keratocystic odontogenic tumors and Carnoy's solution: results and complications assessment. **Oral Diseases**, v. 18, n. 6, p. 548-57, 2012.
- RIVERO, E. R. C., *et al.* Cell block technique as a complementary method in the clinical diagnosis of cyst-like lesions of the jaw. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 3, p. 269-73, 2011.
- RUBINSZTEIN, D. C.; MARIÑO, G.; KROEMER, G. Autophagy and aging. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 682-95, 2011.
- SANTOSH, A. B. R.; OGLE, O. E. Odontogenic tumors. **Dental Clinics**, v. 64, n. 1, p. 121-38, 2020.
- SHARP, R. C., *et al.* Enhanced basal autophagy supports ameloblastoma-derived cell survival and reactivation. **Archives of Oral Biology**, v. 98, n. 61-7, 2019.
- SHEAR, M; SPEIGHT, P. Cysts associated with the maxillary antrum. **Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions**, 4 th ed. p. 162-70, 2007.
- SHIVHARE, P., *et al.* Multilocular radicular cyst - a common pathology with uncommon radiological appearance. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 10, n. 3, p. ZD 13-5 2016.
- STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.

STERN, M. H.; DREIZEN, S.; MACKLER, B. F.; LEVY, B. M. Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts. **Journal of Endodontics**, v. 7, n. 10, p. 447-52, 1981.

STOELINGA, P. J. W. The treatment of odontogenic keratocysts by excision of the overlying, attached mucosa, enucleation, and treatment of the bony defect with Carnoy solution. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1662-6, 2005.

SUKEGAWA, S., *et al.* Morphological characteristics of radicular cysts using computed tomography. **Odontology**, v. 108, n. 1, p. 74-83, 2020.

SUZUKI, T., *et al.* Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions—correlation with inflammatory cells and epithelial cells. **Oral Diseases**, v. 7, n. 6, p. 336-43, 2001.

TAKEDA, Y., *et al.* Mucous and ciliated cell metaplasia in epithelial linings of odontogenic inflammatory and developmental cysts. **Journal of Oral Science**, v. 47, n. 2, p. 77-81, 2005.

TANIDA, I., *et al.* The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 3, p. 1701-1706, 2001.

VERED, M., *et al.* The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and Bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 7, p. 597-604, 2009.

YIN, Z.; PASCUAL, C.; KLIONSKY, D. J. Autophagy: machinery and regulation. **Microbial Cell**, v. 3, n. 12, p. 588-96, 2016.

XU, R., *et al.* The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers: A systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 97, n. 46, p. e12912, 2018.

ZHONG, W. Q., *et al.* Down-regulation of connexin43 and connexin32 in keratocystic odontogenic tumours: potential association with clinical features. **Histopathology**, v. 66, n. 6, p. 798-807, 2015.

ZHU, L., *et al.* The presence of autophagy in human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 11, p. 1379-84, 2013.

ZHU, P., *et al.* Autophagy activators suppress cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 1, p. 158-72, 2017.

# *Apêndices*

---







# *Anexos*

---

## ANEXO A. Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À AUTOFAGIA (Atg7, p62, LC3 e p-mTOR) EM CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS, CISTOS DENTÍGEROS E CISTOS RADICULARES

**Pesquisador:** Cassiano Francisco Weege Nonaka

**Área Temática:** A critério do CEP

**Versão:** 2

**CAAE:** 34024920.6.0000.5187

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.245.830

**Apresentação do Projeto:**

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1578023.pdf, de 01/07/2020) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto\_CEP\_Adequacoes.pdf, de 01/07/2020).

**INTRODUÇÃO**

Os cistos odontogênicos, caracterizados como cavidades patológicas revestidas por epitélio de natureza odontogênica, constituem um importante grupo de lesões que acometem a região bucomaxilofacial (RIVERO et al., 2010; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Nesse grupo, que inclui lesões de origem inflamatória e de desenvolvimento, o cisto radicular (CR), o cisto dentígero (CD) e o ceratocisto odontogênico (CO) assumem posição de destaque por serem os mais prevalentes dos ossos gnáticos (JOHNSON et al., 2014; KAMMER; MELLO; RIVERO, 2020). Além de constituírem os cistos odontogênicos mais frequentes, COs, CDs e CRs apresentam importantes diferenças em relação à patogênese e ao comportamento biológico (GABDAIL et al., 2009; KECHIK; SIAR, 2018). Apesar dos avanços no conhecimento dos mecanismos responsáveis por tais diferenças, com investigações direcionadas à análise da expressão de moléculas envolvidas no ciclo celular (GABDAIL et al., 2009; KECHIK; SIAR, 2018), na angiogênese (DE ANDRADE SANTOS et al., 2011),

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.245.830

Responsável	Adequacoes_PesquisadorResponsavel.pdf	01/07/2020 17:05:49	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_Adequacoes.pdf	01/07/2020 16:01:08	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Adequacoes.pdf	01/07/2020 16:00:52	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Declaração de concordância	AutorizacaoInstitucional.pdf	23/06/2020 20:15:08	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	23/06/2020 20:14:19	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito

### Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 29 de Agosto de 2020

---

**Assinado por:**  
**Jorge Alves de Almeida Venancio**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

**ANEXO B.** Normas de submissão de trabalhos ao periódico *International Endodontic Journal*.**Introduction**

International Endodontic Journal publishes original scientific articles, reviews, clinical articles and case reports in the field of Endodontology; the branch of dental sciences dealing with health, injuries to and diseases of the pulp and periradicular region, and their relationship with systemic well-being and health. Original scientific articles are published in the areas of biomedical science, applied materials science, bioengineering, epidemiology and social science relevant to endodontic disease and its management, and to the restoration of root-treated teeth. In addition, review articles, reports of clinical cases, book reviews, summaries and abstracts of scientific meetings and news items are accepted.

**Preprints and Data Sharing**

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

International Endodontic Journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper. All accepted manuscripts may elect to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Sample statements are available here. If published, statements will be placed in the heading of your manuscript.

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

**Ethical Guidelines**

International Endodontic Journal adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

*Authorship and Acknowledgements*

The policy of the journal is that only ONE corresponding author is accepted. Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

International Endodontic Journal adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of,

88 or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Please find more information on the conflict of interest form in section 2.6.

### *Ethical Approvals*

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

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

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study. The authors **MUST** upload a copy of the ethical approval letter when submitting their manuscript and a separate English translation. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

### **Clinical Trials**

The International Endodontic Journal asks that authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trial a priori in any of the following public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>, <http://isrctn.org/>. Other primary registries if named in the WHO network will also be considered acceptable. The clinical trial registration number and name of the trial register should be included in the Acknowledgements at the submission stage.

### *Randomised control clinical trials*

Randomised clinical trials should be reported using the Preferred Reporting Items for Randomized Trials in Endodontics (PRIRATE) 2020 guidelines. A PRIRATE checklist and flowchart (as a Figure) should also be completed and included in the submission material. The PRIRATE 2020 checklist and flowchart can be downloaded from: <http://prideendodonticguidelines.org/prirate/>.

It is recommended that authors consult the following papers, which explains the rationale for the PRIRATE 2020 guidelines and their importance when writing manuscripts:

Nagendrababu V, Duncan HF, Bjørndal L, Kvist T, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Pigg M, Rechenberg DK, Vaeth M, Dummer P. PRIRATE 2020 guidelines for reporting randomized trials in Endodontics: a consensus-based development. *Int Endod J.* 2020 Mar 20. doi: 10.1111/iej.13294. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13294>).

Nagendrababu V, Duncan HF, Bjørndal L, Kvist T, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Dummer P. PRIRATE 2020 guidelines for reporting randomized trials in Endodontics: Explanation and elaboration. *Int Endod J.* 2020 April 8. doi: 10.1111/iej.13304 (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13304>).

### **Epidemiological observational trials**

Submitting authors of epidemiological human observations studies are required to review and submit a 'strengthening the reporting of observational studies in Epidemiology' (STROBE) checklist and statement. Compliance with this should be detailed in the materials and methods section. ([www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org)).

### **Systematic Reviews**

The abstract and main body of the systematic review should be reported using the PRISMA for Abstract and PRISMA guidelines respectively (<http://www.prisma-statement.org/>). Authors submitting a systematic review should register the protocol in a readily-accessible source at the time of project inception (e.g. PROSPERO database, previously published review protocol in journal). The protocol registration number, name of the database or journal reference should be provided at the submission stage in the "Registration" section in the abstract and 'Methods' section in the main body of the text. A PRISMA checklist and flow diagram (as a Figure) should also be included in the submission material. Source of funding (grant number, if available) should be added in 'Acknowledgements' section.

It is recommended that authors consult the following papers, which help in the production of high quality reviews:

Nagendrababu V, Duncan HF, Tsesis I, Sathorn C, Pulikkotil SJ, Dharmarajan L, Dummer PMH. PRISMA for abstracts: best practice for reporting abstracts of systematic reviews in Endodontology. *Int Endod J.* 2019 Mar 19:1096-07. doi: 10.1111/iej.13118.

Nagendrababu V, Dilokthornsakul P, Jinatongthai P, Veettil SK, Pulikkotil SJ, Duncan HF, Dummer PMH. Glossary for systematic reviews and meta-analyses. *Int Endod J.* 2020 Feb;53(2):232-249. doi: 10.1111/iej.13217. Epub 2019 Nov 25.

### **DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations**

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number,

respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

### **Conflict of Interest and Source of Funding**

International Endodontic Journal requires that all authors (both the corresponding author and co-authors) disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, please contact the editorial office at [iejeditor@cardiff.ac.uk](mailto:iejeditor@cardiff.ac.uk). The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>).

It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms individually (do not combine the forms into one file) together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

### **Appeal of Decision**

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

### **Permissions**

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

### **Copyright Assignment**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. Your article cannot be published until this has been done.

### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA): Creative Commons Attribution License OAA; Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA; Creative Commons Attribution Non-Commercial - No Derivs License OAA.

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley>.

com/authors/faqscopyright-\_301.html and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to nonsubscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp).

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### Manuscript Submission Procedure

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/iej>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from [iejeditor@cardiff.ac.uk](mailto:iejeditor@cardiff.ac.uk).

#### *Getting Started*

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/iej>.
- Log-in, or if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as a new user.
  - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next'.



- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered, but have forgotten your log in details, please enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre '

#### *Submitting Your Manuscript*

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking on the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
  - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

#### **ORCID**

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, International Endodontic Journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Please see Wiley's resources on ORCID [here](#).

#### *Manuscript Files Accepted*

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

#### *Blinded Review*

Manuscript that do not conform to the general aims and scope of the journal will be returned immediately without review. All other manuscripts will be reviewed by experts in the field (generally two referees). International Endodontic Journal aims to forward referees' comments and to inform the corresponding author of the result of the review process. 93

Manuscripts will be considered for fast-track publication under special circumstances after consultation with the Editor.

International Endodontic Journal uses double blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper and the name(s) of the author(s) will not be disclosed to the reviewers.

To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files.

*Please upload:*

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'.
- Figure files under the file designation 'figures'.
- The title page and Acknowledgements where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'.

All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

*Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process*

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

*E-mail Confirmation of Submission*

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

*Manuscript Status*

You can access ScholarOne Manuscripts any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

*Submission of Revised Manuscripts*

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

**Manuscript Types Accepted**

Original Scientific Articles: must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated

and, if necessary, repeated. Original Scientific Articles must conform to the highest international standards in the field.

**Review Articles:** are accepted for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should generally include a clearly defined search strategy and take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work. Extensive or unbalanced citation of the authors' own publications is discouraged.

**Clinical Articles:** are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognised clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

**Case Reports:** illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but they must be of sufficiently high quality to be considered worthy of publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered. Illustrative material must be of the highest quality and healing outcomes, if appropriate, should be demonstrated.

**Supporting Information:** International Endodontic Journal encourages submission of adjuncts to printed papers via the supporting information website (see submission of supporting information below). It is encouraged that authors wishing to describe novel procedures or illustrate cases more fully with figures and/or video may wish to utilise this facility. Letters to the Editor: are also acceptable. Meeting Reports: are also acceptable.

## **Manuscript Format and Structure**

### *Format*

**Language:** The language of publication is English. It is preferred that manuscript is professionally edited.

**Presentation:** Authors should pay special attention to the presentation of their research findings or clinical reports so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable. Abbreviations should also be kept to a minimum, particularly those that are not standard. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

**Article Preparation Support:** Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence. Also, check out our resources for Preparing Your Article for general guidance about writing and preparing your manuscript.

**Abbreviations:** International Endodontic Journal adheres to the conventions outlined in *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*. When non-standard terms appearing 3 or more times in the manuscript are to be abbreviated, they should be written out completely in the text when first used with the abbreviation in parenthesis.

### *Structure*

All manuscripts submitted to International Endodontic Journal should include Title Page, Abstract, Main Text, References and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

Title Page: The title page should bear: (i) Title, which should be concise as well as descriptive; (ii) Initial(s) and last (family) name of each author; (iii) Name and address of department, hospital or institution to which work should be attributed; (iv) Running title (no more than 30 letters and spaces); (v) No more than six keywords (in alphabetical order); (vi) Name, full postal address, telephone, fax number and e-mail address of author responsible for correspondence.

*Abstract for Original Scientific Articles should be no more than 350 words giving details of what was done using the following structure:*

- Aim: Give a clear statement of the main aim of the study and the main hypothesis tested, if any.
- Methodology: Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and statistical tests.
- Results: Give the main results of the study, including the outcome of any statistical analysis.
- Conclusions: State the primary conclusions of the study and their implications. Suggest areas for further research, if appropriate.

*Abstract for Systematic Review Articles should be no more than 350 words using the following structure where applicable:*

- Title: Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.
- Background: Provide a brief introduction of the subject and why it is important.
- Objectives: The research question including components such as participants, interventions, comparators, and outcomes. Use PICO format.
- Methods: Briefly describe i) the inclusion criteria, ii) provide databases searched and dates, iii) mention the method used to assess study quality (risk of bias) iv) meta-analysis methodology (if appropriate).
- Results: i) Number and type of included studies and participants ii) results for main outcomes (benefits and harms). If a meta-analysis was undertaken, include summary measures and confidence intervals. iii) direction of the effect in terms that are meaningful to clinicians and patients.
- Discussion: i) Strengths and ii) limitations of evidence.
- Conclusions: General interpretation of the results and important implications.
- Funding: Primary source of funding for the review (if no funding: say 'none').
- Registration: Registration number and name.

*Abstract for Review Articles (narrative):*

The Abstract should be unstructured and no more than 350 words.

*Abstract for Case Reports should be no more than 350 words using the following structure:*

- Aim: Give a clear statement of the main aim of the report and the clinical problem which is addressed.
- Summary: Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and analysis if any.
- Key learning points: Provide up to 5 short, bullet-pointed statements to highlight the key messages of the report. All points must be fully justified by material presented in the report.

*Abstract for Clinical Articles should be no more than 350 words using the following structure:*

- Aim: Give a clear statement of the main aim of the report and the clinical problem which is addressed.
- Methodology: Describe the methods adopted.
- Results: Give the main results of the study.
- Conclusions: State the primary conclusions of the study.

*Main Text of Original Scientific Article should include Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion:*

- Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and gaps in knowledge. Exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation, or hypothesis to be tested.
- Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced.
  - (i) Clinical Trials should be reported using the PRIRATE 2020 guidelines. A PRIRATE 2020 checklist must be completed and included along with a flow diagram (as a Figure) in the submission material. These are available at <http://pride-endodonticguidelines.org/prirate/>.
  - (ii) Experimental Subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in

the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

- (iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (Company, town/city, state, country) included.
- Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Data should not be duplicated in Tables and Figures.
- Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The Discussion section should progress with a review of the methodology before discussing the results in light of previous work in the field. The Discussion should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.
- Conclusion: should contain a summary of the findings.

*Main Text of systematic review articles should be divided into Introduction, Methods, Results and Conclusions:*

- Introduction: Should be focused to place the subject matter in context and to justify the need for the review.
- Method: Divide into logical sub-sections in order to improve readability and enhance understanding (e.g. details of protocol registration, literature search process, inclusion/exclusion criteria, data extraction, quality assessment, outcome(s) of interest, data synthesis and statistical analysis, quality of evidence).
- Results: Present in structured fashion (e.g. results of the search process, characteristics of the included studies, results of primary meta-analysis, additional analysis, publication bias, quality of evidence).
- Discussion: Should summarize the results, highlighting completeness and applicability of evidence, quality of evidence, agreements and disagreements with other studies or reviews, strength and limitations, implications for practice and research.
- Conclusion(s): Section should reach clear conclusions and/or recommendations on the basis of the evidence presented.

*Main Text of Review Articles should be divided into Introduction, Review and Conclusions.*

The Introduction section should be focused to place the subject matter in context and to justify the need for the review. The Review section should be divided into logical sub-sections in order to improve readability and enhance understanding. Search strategies must be described and the use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. The use of tabulated and illustrative material is encouraged. The Conclusion section should reach clear conclusions and/or recommendations on the basis of the evidence presented.

*Main Text of Case Reports should be divided into Introduction, Report, Discussion and Conclusion.*

They should be well illustrated with clinical images, radiographs, diagrams and, where appropriate, supporting tables and graphs. However, all illustrations must be of the highest quality.

Case reports should be written using the Preferred Reporting Items for Case reports in Endodontics (PRICE) 2020 guidelines. A PRICE checklist and flowchart (as a Figure) should also be completed and included in the submission material. The PRICE 2020 checklist and flowchart can be downloaded from: <http://pride-endodonticguidelines.org/price/>.

It is recommended that authors consult the following papers, which explains the rationale for the PRICE 2020 guidelines and their importance when writing manuscripts:

Nagendrababu V, Chong BS, McCabe P, Shah PK, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Setzer FC, Sunde PT, Dummer PMH. PRICE 2020 guidelines for reporting case reports in Endodontics: a consensus-based development. *Int Endod J.* 2020 Feb 23. doi: 10.1111/iej.13285. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32090342>).

Nagendrababu V, Chong BS, McCabe P, Shah PK, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Dummer PMH. PRICE 2020 guidelines for reporting case reports in Endodontics: Explanation and elaboration. *Int Endod J.* (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13300>).

**Acknowledgements:** International Endodontic Journal requires that all sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Grant or contribution numbers may be acknowledged, and principal grant holders should be listed. Acknowledgments should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. See also above under Ethical Guidelines.

## **References**

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. The EndNote reference style can be obtained upon request to the editorial office ([iejeditor@cardiff.ac.uk](mailto:iejeditor@cardiff.ac.uk)). Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp).

In the text: single or double authors should be acknowledged together with the year of publication, e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990). If more than two authors the first author followed by et al. is sufficient, e.g. (Tobias et al. 1991). If more than 1 paper is cited the references should be in year order and separated by ", " e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990, Tobias et al. 1991).

### *Reference list:*

All references should be brought together at the end of the paper in alphabetical order and should be in the following form.

- (i) Names and initials of up to six authors. When there are seven or more, list the first three and add et al.
- (ii) Year of publication in parentheses.
- (iii) Full title of paper followed by a full stop (.)
- (iv) Title of journal in full (in italics).
- (v) Volume number (bold) followed by a comma (,)
- (vi) First and last pages

*Examples of correct forms of reference follow:*

*Standard journal article*

Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M (1991) Class II antigen-expressing cells in experimentally induced pulpitis. *International Endodontic Journal* 24, 8-14.

*Corporate author*

British Endodontic Society (1983) Guidelines for root canal treatment. *International Endodontic Journal* 16, 192-5.

*Journal supplement*

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M (1979) Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood* 54 (Suppl. 1), 26a.

*Books and other monographs*

*Personal author(s)*

Gutmann J, Harrison JW (1991) *Surgical Endodontics*, 1st edn Boston, MA, USA: Blackwell Scientific Publications.

*Chapter in a book*

Wesselink P (1990) Conventional root-canal therapy III: root filling. In: Harty FJ, ed. *Endodontics in Clinical Practice*, 3rd edn; pp. 186-223. London, UK: Butterworth.

*Published proceedings paper*

DuPont B (1974) Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of the Third Annual Meeting of the International Society for Experimental Rematology*; pp. 44-46. Houston, TX, USA: International Society for Experimental Hematology.

*Agency publication*

Ranofsky AL (1978) *Surgical Operations in Short-Stay Hospitals: United States-1975*. DHEW publication no. (PHS) 78-1785 (Vital and Health Statistics; Series 13; no. 34.) Hyattsville, MD, USA: National Centre for Health Statistics.8

*Dissertation or thesis*



Saunders EM (1988) In vitro and in vivo investigations into root-canal obturation using thermally softened gutta-percha techniques (PhD Thesis). Dundee, UK: University of Dundee.

### *URLs*

Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Smith A (1999) Select committee report into social care in the community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report015285.html> [accessed on 7 November 2003].

### **Tables, Figures and Figure Legends**

**Tables:** Tables should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

**Figures:** All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction, symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by a thin space (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.).

*Figure legends:*

Figure legends should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

*Permissions:*

If all or part of previously published illustrations are to be used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. This is the responsibility of the authors before submission.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixeloriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

*Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures:*

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

*Supporting Information*

Publication in electronic formats has created opportunities for adding details or whole sections in the electronic version only. Authors need to work closely with the editors in developing or using such new publication formats.

Supporting information, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted. It should be clearly stated at the time of submission that the supporting information is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the supporting information is such that it cannot be accommodated on the journal's website, the author agrees to make the supporting information available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the supporting information is located changes. The content of the supporting information must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Information' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The supporting information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

*Preparation of Supporting Information:*

Although provision of content through the web in any format is straightforward, supporting information is best provided either in web-ready form or in a form that can be conveniently converted into one of the standard web publishing formats:

- Simple word-processing files (.doc or .rtf) for text.
- PDF for more complex, layout-dependent text or page-based material. Acrobat files can be distilled from Postscript by the Publisher, if necessary.
- GIF or JPEG for still graphics. Graphics supplied as EPS or TIFF are also acceptable.
- MPEG or AVI for moving graphics.

Subsequent requests for changes are generally unacceptable, as for printed papers. A charge may be levied for this service.

*Video Imaging:*

For the on-line version of the Journal the submission of illustrative video is encouraged. Authors proposing the use such media should consult with the Editor during manuscript preparation.

*Article Promotion Support*

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

**After Acceptance**

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

*Figures*

Hard copies of all figures and tables are required when the manuscript is ready for publication. These will be requested by the Editor when required. Each Figure copy should be marked on the reverse with the figure number and the corresponding author's name.

*Proof Corrections*

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html). This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other

than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

#### *Early Online Publication Prior to Print*

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

#### *Online Production Tracking*

Online production tracking is available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

#### *Author Material Archive Policy*

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

#### *Offprints*

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: Sheridan Printer. If you have queries about offprints please email Customer Service. The corresponding author will be sent complimentary copies of the issue in which the paper is published (one copy per author).

#### *Author Services*

For more substantial information on the services provided for authors, please see Wiley Blackwell Author Services. Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

*Guidelines for reporting of DNA microarray data*

The International Endodontic Journal gives authors notice that, with effect from 1st January 2011, submission to the International Endodontic Journal requires the reporting of microarray data to conform to the MIAME guidelines. After this date, submissions will be assessed according to MIAME standards. The complete current guidelines are available at [http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame\\_2.0.html](http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_2.0.html). Also, manuscripts will be published only after the complete data has been submitted into the public repositories, such as GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or ArrayExpress ([http://www.ebi.ac.uk/microarray/submissions\\_overview.html](http://www.ebi.ac.uk/microarray/submissions_overview.html)), in MIAME compliant format, with the data accession number (the identification number of the data set in the database) quoted in the manuscript. Both databases are committed to keeping the data private until the associated manuscript is published, if requested.

Prospective authors are also encouraged to search for previously published microarray data with relevance to their own data, and to report whether such data exists. Furthermore, they are encouraged to use the previously published data for qualitative and/or quantitative comparison with their own data, whenever suitable. To fully acknowledge the original work, an appropriate reference should be given not only to the database in question, but also to the original article in which the data was first published. This open approach will increase the availability and use of these large-scale data sets and improve the reporting and interpretation of the findings, and in increasing the comprehensive understanding of the physiology and pathology of endodontically related tissues and diseases, result eventually in better patient care.