



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE LUCENA

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CISTOS RADICULARES, CISTOS
DENTÍGEROS E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS**

CAMPINA GRANDE – PB

2020

ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE LUCENA

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 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

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita

CAMPINA GRANDE – PB

2020

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.

A553i Andrade, Allany de Oliveira.
Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos [manuscrito] / Allany de Oliveira Andrade. - 2020.
106 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.
"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
"Coorientação: Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita, UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais"
1. Cisto radicular. 2. Cisto dentígero. 3. CXCL12. 4. CXCR4. I. Título

21. ed. CDD 617.6

ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE LUCENA

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 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.

Apresentado em 03/07/2020

BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves/ UEPB
Membro Titular (2º Examinador)



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

Dedicatória

Dedico este trabalho **a Deus,**
A minha amada **mãe Denise de Oliveira Andrade,**
A minha eterna saudade, **vovô João Sabino de Oliveira** (*In memoriam*),
E ao meu grande amor e **esposo, Rafael Gomes de Lucena.**

Quem sempre estiveram ao meu lado apoiando e me direcionando para o caminho do bem. Todas as palavras de gratidão parecem escassas porque não expressam o verdadeiro significado que tiveram neste percurso e na minha vida.

Agradecimentos especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus estimados agradecimentos ao meu orientador **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, um educador extremamente doado e comprometido com o ensino de excelência e a pessoa que mais te surpreende positivamente com a convivência. Àqueles que têm o prazer de conhecer verdadeiramente a pessoa Cassiano Nonaka sabe o quanto ele ensina, disciplina e te prepara para a vida acadêmica, mas além disso, é o professor que se preocupa com o seu bem-estar, aquele que te liga e passa horas te consolando quando não está tudo bem. Que confia no seu potencial e te estimula a crescer cada vez mais, um verdadeiro treinador que vibra a cada conquista. Desse mestrado, além de todo o conhecimento adquirido, fica o exemplo a ser seguido, de professor que ensina, mas acima de tudo, que acolhe. Obrigada por tudo, por sua orientação, amizade e conselhos. O senhor está sendo na minha vida um grande mestre e amigo!

Agradeço ao grande mestre **Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita**, por seus ensinamentos e contribuições nesta pesquisa. É uma grande honra tê-lo como contribuidor. Em especial, agradeço ao fraterno acolhimento na missão do PROCAD, cujo acontecimento foi de extrema importância acadêmica e de amadurecimento pessoal. Nem em meus melhores sonhos poderia imaginar que um professor pudesse transformar uma viagem profissional em uma experiência tão familiar. Obrigada por seus cuidados, experiência e pelos conhecimentos cedidos.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a **Deus**, que foi o meu guia e refúgio nessa jornada. Sem a sua infinita sabedoria, jamais teria conseguido. As suas mãos me sustentaram desde a minha concepção delicada e até aqui nunca me deixou faltar nada, minha vida não teria nenhum sentido se não pudesse testemunhar o seu amor e misericórdia.

À minha **mãe Denise de Oliveira Andrade**, a quem devo eterna devoção por toda a sua dedicação e renúncia, és minha fonte inspiradora na Terra. Nunca serei grata o suficiente por todo apoio. Apenas louvo a Deus por tê-la ao meu lado, pois sem a tua força e o seu amor eu nada seria.

Ao meu **vovô João Sabino de Oliveira** (*In memoriam*), a pessoa que semeou as primeiras sementes da educação, quem se orgulhava a cada pequena conquista minha e estava nas reuniões de pais da escola, sei que onde estiver seu coração está em paz e muito feliz por mim, minha eterna saudade e gratidão.

Ao meu **pai Aldemir Ferreira de Andrade** (*In memoriam*), sei que Deus me protege todos os dias com os seus anjos e sinto que o senhor está entre eles. Eternas saudades!

Ao meu amoroso **esposo, Rafael Gomes de Lucena**, meu porto seguro, obrigada por sua compreensão nas ausências e seu apoio para a realização desse sonho. Nenhuma conquista teria o mesmo sabor sem você ao meu lado.

A todos os meus **amigos e familiares**, em especial ao meu **irmão Allan de Oliveira Andrade** e **cunhada Maria Valdenia Felix Andrade**, que me apoiaram e torceram por esse momento, minha eterna gratidão.

Aos meus **sogros Mariedna Gomes de Lucena e João Bosco de Lucena**, verdadeiros anjos na minha vida e “segundos pais”. Guardo um imenso carinho e admiração pelos senhores.

Aos meus colegas de turma, **Ana Karina Rolim, Carlus Alberto, Diego Silva, Gélica Granja, Jhonatan Tiago, Wliana Pontes** e em especial, **Natália Duarte** e **Walter Morais** que compartilharam comigo muitos momentos importantes. Nossa convivência foi leve e de

muita aprendizagem, agradeço a cada um de vocês por terem feito dessa jornada uma oportunidade única de crescimento profissional e pessoal.

Aos **meus professores da graduação Dr. Rodrigo Gadelha Vasconcelos, Dr. Marcelo Gadelha Vasconcelos e Dr. Edson Vasconcelos Peixoto**, que me despertaram durante a trajetória acadêmica para a vida docente e me lapidaram para conseguir esse objetivo, minha eterna gratidão.

Ao professor **Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, por sua leveza como pessoa e educador, por me ensinar a ter orgulho da minha formação e por todo o conhecimento cedido.

À professora **Dra. Pollianna Muniz Alves**, por todo conhecimento, ajuda e convivência familiar que foram compartilhados, suas contribuições foram de suma importância para o desenvolvimento desta pesquisa. A senhora com muita elegância inspira a ter amor a profissão.

À **Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, que foi minha professora no primeiro período de graduação e hoje tenho a honra de tê-la como banca. Ter uma pessoa que viu os meus primeiros passos profissionais e hoje poder demonstrar o meu progresso é uma grande responsabilidade, mas encarada com muito carinho. Obrigada pelo conhecimento compartilhado.

Aos professores do PPGO e colaboradores (Prof. **Dr. Alessandro Cavalcanti**, Profa. **Dra. Ana Flávia Granville**, Prof. **Dr. Cassiano Nonaka**, Profa. **Dra. Daliana Queiroga**, Profa. **Dra. Daniela Pita**, Profa. **Dra. Edja Maria Costa**, Profa. **Dra. Jozinete Pereira**, Prof. **Dr. Kenio Lima**, Prof. **Dr. Manuel Gordón-Núñez**, Profa. **Dra. Maria Helena Catão**, Profa. **Dra. Patrícia Bento**, Profa. **Dra. Pollianna Muniz**, Profa. **Dra. Renata Rocha**, Profa. **Dra. Andreza Cristina Massoni** e Prof. **Dr. Sérgio d'Ávila**), que com vontade, sabedoria e competência compartilharam conosco seus conhecimentos tornando-nos eternos aprendizes da ciência.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta dissertação Profa. **Dra. Pollianna Muniz Alves**, Profa. **Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, Prof. **Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez** e Profa. **Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira** pelo aceite em

participação desta banca, pelo empenho e dedicação na leitura deste trabalho e, desde já, pelas contribuições que serão apresentadas.

Às **técnicas de laboratório Ana Luzia Batista e Denize Núbia** por todo auxílio, amizade e carinho. As orações e o jeitinho de bem com a vida de Ana e as gargalhadas compartilhadas com Denize fizeram com que a caminhada no laboratório fosse mais reconfortante e alegre. A ajuda de vocês foi imprescindível para realização desta pesquisa e outros projetos, muito obrigada por toda a dedicação com o trabalho e o acolhimento que tiveram comigo.

A todos os amigos que fizeram parte das atividades do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB: **Emanuene Galdino, Fabianna Medeiros, Luana Balduino, Luan Éverton** que me ensinaram com muito carinho as técnicas necessárias para a construção do meu conhecimento, aos colegas **Daniella Lucena, Wliana Pontes, Walter Morais, Amanda Lira, Catarina Monteiro e Christany Rodrigues**, que tivemos o processo de aprendizagem em conjunto, e às alunas de Iniciação Científica: **Helen Kaysa, Vanessa Alves e Raelly Katharinne**, pelos bons momentos vivenciados. Foi estabelecido nesse ambiente de trabalho uma parceria de muita união e colaboração. Agradeço em especial à **Emanuene Galdino, Luana Balduino e Walter Morais** pela estimada ajuda com a execução da imunohistoquímica da minha pesquisa.

Ao *Team Nonaka* composto por **Amanda Lira, Daniella Lucena, Emanuene Galdino, Fabianna Medeiros, Luana Balduino e Christany Rodrigues**, esse grupo de pesquisa formado por mulheres admiráveis me permitiu um crescimento profissional e pessoal que não tenho palavras para descrever. Em especial, **Emanuene Galdino e Luana Balduino** agradeço por cada palavra, apoio e direcionamento, vocês foram anjos de luz na minha caminhada.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, especialmente **Ahyanna Nóbrega** pela compreensão e dedicação ao serviço, e **Dione**, pelo exemplo de esforço e alegria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pela oportunidade de realizar minha pesquisa com período sanduíche no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta pesquisa, obrigada!

Resumo

RESUMO

O cisto radicular (CR), o cisto dentígero (CD) e o ceratocisto odontogênico (CO) são os cistos odontogênicos que ocorrem com maior frequência na região bucomaxilofacial, mas diversos aspectos relacionados à patogênese e ao comportamento biológico dessas lesões permanecem incompletamente compreendidos. Nesse cenário, estudos têm sugerido que as quimiocinas e seus receptores, com destaque para CXCL12 e CXCR4, podem ser importantes na patogênese de cistos odontogênicos inflamatórios. Até o momento, porém, pouco se sabe sobre a expressão dessas proteínas em cistos odontogênicos de desenvolvimento. Dessa forma, este estudo se propôs a avaliar a imunexpressão de CXCL12 e CXCR4 em CRs, CDs e COs. A amostra foi constituída por 20 CRs, 20 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 (MOREIRA *et al.*, 2000) e a intensidade do infiltrado inflamatório (PEIXOTO *et al.*, 2012) nos CRs, bem como a presença de cistos satélites e brotamentos epiteliais nos COs (MYOUNG *et al.*, 2001). Para o estudo imunoistoquímico, sob aumento de 400×, foram estabelecidos os percentuais de células com positividade citoplasmática (CXCL12 e CXCR4) e nuclear (CXCR4) em 10 campos microscópicos do revestimento epitelial e da cápsula fibrosa (BRITO *et al.*, 2018). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio dos testes de Mann-Whitney e de correlação de Spearman ($p < 0,05$). Foi constatada maior frequência de CRs com infiltrado inflamatório grau III (65,0%) e com revestimento epitelial hiperplásico (55,0%). Em relação aos COs, não foram constatados cistos satélites ou brotamentos epiteliais em nenhum dos casos avaliados. Na análise imunoistoquímica, constatou-se menor percentual de positividade epitelial para CXCL12 nos COs quando comparados aos CDs ($p < 0,001$) e CRs ($p = 0,001$). Na cápsula fibrosa, os CDs exibiram maior imunexpressão de CXCL12 em comparação aos CRs ($p = 0,004$) e COs ($p = 0,042$). Em relação ao CXCR4, foi observado menor percentual de positividade citoplasmática no componente epitelial dos COs quando comparados aos CRs ($p < 0,001$) e CDs ($p < 0,001$). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de positividade nuclear para CXCR4, no revestimento epitelial, entre CRs, CDs e COs ($p > 0,05$). Na cápsula fibrosa, os COs apresentaram menores percentuais de positividade citoplasmática para CXCR4 quando comparados aos CDs ($p = 0,007$) e CRs ($p = 0,022$). A análise da expressão nuclear de CXCR4 na cápsula fibrosa revelou maior percentual de positividade nos CDs quando comparados aos COs ($p = 0,007$). Não foram constatadas diferenças significativas nas expressões de CXCL12 e CXCR4 em relação às características morfológicas dos CRs ($p > 0,05$). Nos CRs, foram identificadas correlações positivas entre as expressões citoplasmática e nuclear de CXCR4, tanto no revestimento epitelial ($r = 0,597$; $p = 0,005$) quanto na cápsula fibrosa ($r = 0,555$; $p = 0,011$). Além disso, na cápsula fibrosa dos CRs, constatou-se correlação positiva entre a expressão de CXCL12 e a expressão nuclear de CXCR4 ($r = 0,523$; $p = 0,018$). Nos CDs, houve correlação entre as expressões citoplasmática e nuclear de CXCR4, tanto no revestimento epitelial ($r = 0,678$; $p = 0,001$) quanto na cápsula fibrosa ($r = 0,937$; $p < 0,001$). Nos COs, foi observada correlação positiva entre as expressões citoplasmática e nuclear de CXCR4 na cápsula fibrosa ($r = 0,796$; $p < 0,001$). Os resultados deste estudo sugerem uma importante participação da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 na patogênese de CRs, CDs e COs. Essas proteínas podem ser particularmente relevantes no desenvolvimento de cistos odontogênicos com comportamento biológico menos agressivo.

Palavras-chave: Cisto radicular. Cisto dentígero. Cistos odontogênico. Quimiocina CXCL12. Receptores CXCR4. Imunoistoquímica.

Abstract

ABSTRACT

Radicular cyst (RC), dentigerous cyst (DC) and odontogenic keratocyst (OKC) are the most frequently occurring odontogenic cysts in the oral and maxillofacial region, but several aspects related to the pathogenesis and biological behavior of these lesions remain incompletely understood. In this scenario, studies have suggested that chemokines and their receptors, especially CXCL12 and CXCR4, may be important in the pathogenesis of inflammatory odontogenic cysts. So far, however, little is known about the expression of these proteins in developmental odontogenic cysts. Thus, this study aimed to evaluate the immunoeexpression of CXCL12 and CXCR4 in RCs, DCs and OKCs. The sample consisted of 20 RCs, 20 DCs and 20 OKCs. Clinical data (sex, age and anatomical location of the lesions) were collected from biopsy request forms. In the morphological study, the pattern of the epithelial lining (MOREIRA *et al.*, 2000) and the intensity of the inflammatory infiltrate (PEIXOTO *et al.*, 2012) in RCs were evaluated, as well as the presence of satellite cysts and epithelial budding in OKCs (MYOUNG *et al.*, 2001). For the immunohistochemical study, at 400× magnification, the percentages of cells with cytoplasmic (CXCL12 and CXCR4) and nuclear (CXCR4) positivity in 10 microscopic fields of the epithelial lining and fibrous capsule (BRITO *et al.*, 2018) were determined. The data obtained were submitted to statistical analysis using the Mann-Whitney and Spearman correlation tests ($p < 0.05$). There was a higher frequency of RCs with inflammatory infiltrate grade III (65.0%) and with hyperplastic epithelial lining (55.0%). Regarding OKCs, no satellite cysts or epithelial budding were found in any of the cases evaluated. In immunohistochemical analysis, a lower percentage of epithelial positivity for CXCL12 was found in OKCs when compared to DCs ($p < 0.001$) and RCs ($p = 0.001$). In the fibrous capsule, DCs showed higher immunoeexpression of CXCL12 compared with RCs ($p = 0.004$) and OKCs ($p = 0.042$). Regarding CXCR4, a lower percentage of cytoplasmic positivity was observed in the epithelial component of OKCs when compared to RCs ($p < 0.001$) and DCs ($p < 0.001$). There were no statistically significant differences in the percentages of nuclear positivity for CXCR4, in the epithelial lining, between RCs, DCs and OKCs ($p > 0.05$). In the fibrous capsule, OKCs showed lower percentages of cytoplasmic positivity for CXCR4 when compared to DCs ($p = 0.007$) and RCs ($p = 0.022$). Analysis of the nuclear expression of CXCR4 in the fibrous capsule revealed a higher percentage of positivity in DCs when compared to OKCs ($p = 0.007$). No significant differences were found in the expressions of CXCL12 and CXCR4 regarding the morphological characteristics of RCs ($p > 0.05$). In RCs, positive correlations were identified between the cytoplasmic and nuclear expressions of CXCR4, both in the epithelial lining ($r = 0.597$; $p = 0.005$) and in the fibrous capsule ($r = 0.555$; $p = 0.011$). In addition, in the fibrous capsule of RCs, there was a positive correlation between the expression of CXCL12 and the nuclear expression of CXCR4 ($r = 0.523$; $p = 0.018$). In DCs, there was a correlation between the cytoplasmic and nuclear expressions of CXCR4, both in the epithelial lining ($r = 0.678$; $p = 0.001$) and in the fibrous capsule ($r = 0.937$; $p < 0.001$). In OKCs, a positive correlation was observed between the cytoplasmic and nuclear expressions of CXCR4 in the fibrous capsule ($r = 0.796$; $p < 0.001$). The results of this study suggest an important participation of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in the pathogenesis of RCs, DCs, and OKCs. These proteins may be particularly relevant in the development of odontogenic cysts with less aggressive biological behavior.

Keywords: Radicular cyst. Dentigerous cyst. Odontogenic cysts; Chemokine CXCL12. Receptors CXCR4. Immunohistochemistry.

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- CCR1:** Do inglês *C-C motif chemokine receptor 1*, refere-se ao receptor de quimiocina CCR1.
- CCR2:** Do inglês *C-C motif chemokine receptor 2*, refere-se ao receptor de quimiocina CCR2.
- CCR3:** Do inglês *C-C motif chemokine receptor 3*, refere-se ao receptor de quimiocina CCR3.
- CCR5:** Do inglês *C-C motif chemokine receptor 5*, refere-se ao receptor de quimiocina CCR5.
- CCR6:** Do inglês *C-C motif chemokine receptor 6*, refere-se ao receptor de quimiocina CCR6.
- CD:** Cisto dentífero.
- CD1a:** Do inglês *cluster of differentiation 1a*, traduzido como grupamento de diferenciação 1a.
- CD4:** Do inglês *cluster of differentiation 4*, traduzido como grupamento de diferenciação 4.
- CD14:** Do inglês *cluster of differentiation 14*, traduzido como grupamento de diferenciação 14.
- CD19:** Do inglês *cluster of differentiation 19*, traduzido como grupamento de diferenciação 19.
- CD84:** Do inglês *cluster of differentiation 84*, traduzido como grupamento de diferenciação 84.
- CD117:** Do inglês *cluster of differentiation 117*, traduzido como grupamento de diferenciação 117.
- CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- CO:** Ceratocisto odontogênico.
- CR:** Cisto radicular.
- CXCL12:** Do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 12*, refere-se à quimiocina CXCL12.
- CXCR3:** Do inglês *C-X-C chemokine receptor type 3*, traduzido como receptor de quimiocina CXC tipo 3.

- CXCR4:** Do inglês *C-X-C chemokine receptor type 4*, traduzido como receptor de quimiocina CXC tipo 4.
- CXCR7:** Do inglês *C-X-C chemokine receptor type 7*, traduzido como receptor de quimiocina CXC tipo 7.
- ELAM-1:** Do inglês *endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*, traduzido como molécula de adesão leucocitária endotelial 1.
- ELISA:** Do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*, traduzido como ensaio de imunoabsorção enzimática.
- GLI-1:** Do inglês *GLI family zinc finger 1*, refere-se ao fator de transcrição GLI-1.
- GM-CSF:** Do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, traduzido como fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófago.
- HBD-2:** Do inglês *human beta defensin 2*, traduzido como beta-defensina humana 2.
- HCl:** Ácido clorídrico.
- ICAM-1:** Do inglês *intercellular adhesion molecule 1*, traduzido como molécula de adesão intercelular 1.
- IFN- γ :** Do inglês *interferon gamma*, traduzido como interferon-gama.
- IL-1 α :** Do inglês *interleukin-1 α* , traduzido como interleucina 1 α .
- IL-1 β :** Do inglês *interleukin-1 β* , traduzido como interleucina 1 β .
- IL-2:** Do inglês *interleukin-2*, traduzido como interleucina 2.
- IL-4:** Do inglês *interleukin-4*, traduzido como interleucina 4.
- IL-5:** Do inglês *interleukin-5*, traduzido como interleucina 5.
- IL-6:** Do inglês *interleukin-6*, traduzido como interleucina 6.
- IL-8:** Do inglês *interleukin-8*, traduzido como interleucina 8.
- IL-10:** Do inglês *interleukin-10*, traduzido como interleucina 10.
- IL-12:** Do inglês *interleukin-12*, traduzido como interleucina 12.
- IL-13:** Do inglês *interleukin-13*, traduzido como interleucina 13.
- IL-15:** Do inglês *interleukin-15*, traduzido como interleucina 15.
- IL-17:** Do inglês *interleukin-17*, traduzido como interleucina 17.
- IL-23:** Do inglês *interleukin-23*, traduzido como interleucina 23.
- kDa:** Do inglês *kilodalton*, traduzido como quilodálton.
- MCP-1:** Do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*, traduzido como proteína quimiotática de monócitos-1.

- MIP-1 β** : Do inglês *macrophage inflammatory protein 1 β* , traduzido como proteína inflamatória de macrófagos 1 β .
- MMP-9**: Do inglês *matrix metalloproteinase-9*, traduzido como metaloproteinase de matriz-9.
- P53**: Do inglês *protein 53*, refere-se ao gene *P53* ou à proteína P53.
- P63**: Do inglês *protein 63*, refere-se ao gene *P63* ou à proteína P63.
- PCR**: Do inglês *polymerase chain reaction*, traduzido como reação em cadeia da polimerase.
- PTCH**: Do inglês *patched*, refere-se ao gene *PTCH* ou à proteína PTCH.
- RANTES**: Do inglês *regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted*, refere-se à proteína RANTES.
- SDF-1 α** : Do inglês *stromal cell-derived factor-1 α* , traduzido como fator 1 α derivado de células estromais.
- SHH**: Do inglês *sonic hedgehog*, refere-se ao gene *SHH* ou à proteína SHH.
- SMO**: Do inglês *smoothed*, refere-se ao gene *SMO* ou à proteína SMO.
- SPSS**: Do inglês *statistical package for the social sciences*, traduzido como Pacote Estatístico para as Ciências Sociais.
- TGF- β** : Do inglês *transforming growth factor- β* , traduzido como fator transformador de crescimento- β .
- Th1**: Do inglês *T helper type 1 cell*, traduzido como célula T auxiliar tipo 1.
- Th2**: Do inglês *T helper type 2 cell*, traduzido como célula T auxiliar tipo 2.
- Th17**: Do inglês *T helper type 17 cell*, traduzido como célula T auxiliar tipo 17.
- TNF**: Do inglês *tumor necrosis factor*, traduzido como fator de necrose tumoral.
- TNF- α** : Do inglês *tumor necrosis factor- α* , traduzido como fator de necrose tumoral- α .
- TNF- β** : Do inglês *tumor necrosis factor- β* , traduzido como fator de necrose tumoral- β .
- TREG**: Do inglês *regulatory T cell*, traduzido como célula T regulatória.
- TRIS**: Tris (hidroximetil) aminometano.
- UEPB**: Universidade Estadual da Paraíba.
- USA**: Do inglês *United States of America*, traduzido como Estados Unidos da América.
- 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 fator de crescimento endotelial vascular.

Lista de ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Classificação das quimiocinas quanto as suas funções e seus respectivos receptores.....	32
Figura 2. Vias de transdução ativadas pela interação de CXCL12 e CXCL11 com os receptores CXCR4 e CXCR7.....	33
Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes e independentes analisadas.....	42
Quadro 2. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários.....	44
Figura 1. BloxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti-CXCL12 (A) e anti-CXCR4 (citoplasma [B] e núcleo [C]) em epitélio e cápsula fibrosa de COs, CRs e CDs.....	68
Figura 2. Expressão citoplasmática de CXCL12 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa de CR (A), CD (B) e CO (C) (<i>Immunohistoprobe PlusTM</i> , 200×).....	69
Figura 3. Expressão citoplasmática de CXCR4 no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C). Detalhe da expressão de CXCR4 no núcleo de células do componente epitelial e no citoplasma de células da cápsula fibrosa de CR (D), CD (E) e CO (F) (<i>Immunohistoprobe PlusTM</i> , 200×).....	70

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos casos de CR, CD e CO de acordo com os dados clínicos.....	65
Tabela 2.	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.....	65
Tabela 3.	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 e significância estatística (<i>P</i>) para as imunorexpressões de CXCL12 e CXCR4 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa dos CRs de acordo com o padrão do epitélio e a intensidade do infiltrado inflamatório.....	66
Tabela 4.	Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (<i>r</i>) e significância estatística (<i>P</i>) para as imunorexpressões de CXCL12 e CXCR4 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa dos CRs, CDs e COs.....	67

Sumário

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	27
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivo geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	METODOLOGIA.....	40
3.1	Considerações éticas.....	40
3.2	Caracterização do estudo.....	40
3.3	População.....	40
3.4	Amostra.....	40
3.4.1	Critérios de inclusão.....	40
3.4.2	Critérios de exclusão.....	40
3.5	Variáveis.....	41
3.6	Estudo clínico.....	41
3.7	Estudo morfológico.....	42
3.8	Estudo imunoistoquímico.....	42
3.8.1	Método imunoistoquímico.....	42
3.8.2	Análise imunoistoquímica.....	44
3.9	Análise estatística.....	45
4	ARTIGO.....	47
4.1	Apresentação.....	47
4.2	Artigo a ser submetido.....	48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXOS.....	81
	APÊNDICES.....	104

Considerações iniciais

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Cisto pode ser definido como uma cavidade patológica revestida por epitélio, que pode apresentar um material líquido ou semissólido em seu interior (RIVERO *et al.*, 2010). Os cistos odontogênicos de origem inflamatória, como o cisto radicular (CR), e de desenvolvimento, como o cisto dentífero (CD) e o ceratocisto odontogênico (CO), são os que ocorrem com maior frequência na região bucomaxilofacial (BHAKHAR *et al.*, 2016; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Apesar dos avanços no conhecimento da patogênese dessas lesões e dos mecanismos responsáveis pelas diferenças nos seus comportamentos biológicos, esses processos permanecem incompletamente compreendidos.

O CR é uma lesão de origem inflamatória (EL-NAGGAR *et al.*, 2017) que se desenvolve nos tecidos periapicais como resultado de uma resposta imunológica a microrganismos presentes nos canais radiculares (GOMES *et al.*, 2018). Ele é considerado o mais comum dos cistos odontogênicos, representando aproximadamente 54,6 a 61,4% de todas as lesões periapicais (DE SOUZA *et al.*, 2010; JOHNSON *et al.*, 2014; BERNARDI *et al.*, 2015; SEVEKAR *et al.*, 2018).

Sua histopatogênese está relacionada à proliferação dos restos de Malassez. Em decorrência da progressão da resposta inflamatória contra microrganismos presentes nos canais radiculares, em direção à região periapical, mediadores químicos estimulam a proliferação dos restos epiteliais de Malassez (NAIR, 1998; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; KEINAN *et al.*, 2013; BERNARDI *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018). Tais remanescentes epiteliais em proliferação constituem massas celulares sólidas que, subsequentemente, desenvolvem espaços cavitários centrais (NAIR, 2004; LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007). Dentre as teorias descritas para a formação desta cavidade cística central, destacam-se a da deficiência nutricional, a do abscesso e a fusão da teoria das cadeias epiteliais (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007).

Na patogênese dos CRs, pesquisas evidenciam a participação de diversas proteínas, com destaque para aquelas envolvidas na angiogênese, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (NONAKA *et al.*, 2008; RUIZ *et al.*, 2010) e a metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) (RUIZ *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017), e nas respostas imunoinflamatórias, como as galectinas-1, -3 e -7 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2018). Estudos ressaltam, ainda, a participação de células envolvidas na regulação da resposta imune, como as células T regulatórias e os linfócitos Th17 (DE ANDRADE *et al.*, 2013; NAUFEL *et al.*, 2017).

Os CRs possuem, como característica clínica, a resposta negativa do dente envolvido aos testes pulpares térmicos e elétricos. Apresentam crescimento lento e são assintomáticos, a menos que haja inflamação aguda na área, que pode ocasionar dor ou sensibilidade. Em casos de lesões extensas, podem também ser observados: sensibilidade, mobilidade dentária, tumefação regional e assimetria facial (SEVEKAR *et al.*, 2018). Radiograficamente, os CRs são caracterizados por área radiolúcida, geralmente circular ou ovoide, com margens radiopacas contíguas à lâmina dura do dente envolvido. O seu tamanho pode variar de 5 mm até grandes proporções (BAVA *et al.*, 2015).

Ao exame histopatológico, os CRs exibem 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 e exocitose (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003). Em alguns casos, podem ser observadas estruturas hialinas lamelares ou globulares no revestimento epitelial, denominadas corpúsculos de Rushton. A cápsula de tecido conjuntivo fibroso, de densidade variável, é permeada por infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, plasmócitos, linfócitos e macrófagos, alguns destes últimos com aspecto espumoso. Podem ser observados, ainda, corpúsculos de Russell, espaços negativos de cristais de colesterol, células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho e granulomas de anéis hialinos (LIAPATAS; NAKOU; RONTOGIANNI, 2003; WOO, 2012; KONTOGIANNIS *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018).

Várias modalidades de tratamento vêm sendo sugeridas para o CR, dentre as quais se destacam as terapias conservadoras, através da intervenção endodôntica do dente desvitalizado com ou sem apicectomia. No entanto, quando os sinais e sintomas persistem e a cicatrização completa do osso alveolar periapical não ocorre, a curetagem cirúrgica ou enucleação são empregadas, com baixa taxa de recidiva (BAVA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018; SEVEKAR *et al.*, 2018).

No contexto dos cistos odontogênicos, o CD assume posição de destaque por ser o cisto de desenvolvimento mais comum (JOHNSON *et al.*, 2014). Essa lesão representa de 20 a 24% dos cistos odontogênicos (DE SOUZA *et al.*, 2010; JOHNSON *et al.*, 2014; DE CARVALHO; LUNA, 2016; CHANG *et al.*, 2017). Sua histopatogênese, apesar de incompletamente esclarecida, pode estar relacionada a alterações, após a conclusão da amelogênese, que resultam no acúmulo de líquido entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte e a coroa dentária (CHANG *et al.*, 2017; ANTHONAPPA *et al.*, 2018).

No desenvolvimento e expansão dos CDs, estudos têm ressaltado a participação de diversas proteínas, com destaque para aquelas envolvidas no ciclo celular, como P63 e P53

(JAAFARI-ASHKAVAND; GERAMIZADEH; RANJBAR, 2015; COȘARCĂ *et al.*, 2016), e na angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o receptor 2 do VEGF (VEGFR2) (FRIEDLANDER *et al.*, 2015).

O CD se caracteriza como uma lesão que envolve a coroa de um dente não erupcionado e, geralmente, não apresenta grandes proporções (COȘARCĂ *et al.*, 2016; ANTHONAPPA *et al.*, 2018). Acomete principalmente indivíduos leucodermas, do sexo masculino e na terceira década de vida, normalmente associado a terceiros molares mandibulares, seguidos por caninos maxilares (COȘARCĂ *et al.*, 2016; GHANDOUR *et al.*, 2018). Em alguns casos, podem ser observados deslocamento dos dentes afetados, expansão óssea e, quando secundariamente infectados, sintomatologia dolorosa (ALLISON; GARLINGTON, 2017).

Ao exame radiográfico, os CDs se apresentam como uma lesão radiolúcida de limites bem definidos, envolvida por halo radiopaco, associada à coroa de um dente retido, fixando-se na junção amelocementária. De modo geral, os CDs são assintomáticos e por consequência são diagnosticados nos exames radiográficos de rotina (DAGUS *et al.*, 2016; DE CARVALHO; LUNA, 2016; HUANG *et al.*, 2019).

Histopatologicamente, os CDs revelam cavidade patológica revestida por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, de poucas camadas, com interface plana em relação à cápsula fibrosa circunvizinha (ALLISON; GARLINGTON, 2017; HUANG *et al.*, 2019). Na ausência de inflamação, a cápsula fibrosa apresenta tecido conjuntivo organizado de forma frouxa. Por outro lado, quando há inflamação secundária, evidencia-se maior deposição de colágeno na cápsula fibrosa (ALLISON; GARLINGTON, 2017). Em alguns casos, o revestimento epitelial pode exibir áreas focais constituídas por células mucosas e células ciliadas. No entanto, quando secundariamente inflamados, os CDs podem apresentar áreas de hiperplasia no revestimento epitelial, com projeções arciformes, e espessamento da cápsula fibrosa (CHANG *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2019).

O tratamento recomendado para o CD consiste na enucleação e, quando necessária, remoção do dente associado. Essa abordagem é definitiva na maioria dos casos de CD, embora os de grandes dimensões possam ser tratados com descompressão prévia. A marsupialização também é indicada em cistos de grande volume, onde a enucleação afetaria a integridade da mandíbula. O prognóstico desta lesão é favorável (ALLISON; GARLINGTON, 2017; GENDVILIENE *et al.*, 2017; BORRÁS-FERRERE *et al.*, 2018).

Em comparação com outros cistos odontogênicos, os COs se destacam pelo comportamento clínico potencialmente agressivo e pela associação com a síndrome de Gorlin (JAEGER *et al.*, 2017; DE CASTRO *et al.*, 2017; BORGHESI *et al.*, 2018). A patogênese desse

cisto odontogênico tem sido fortemente relacionada a mutações no gene *PTCH* (BARRETO *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 2013; BORGHESI *et al.*, 2018).

A proteína *PTCH* atua como um receptor transmembrana na via de sinalização que envolve as proteínas *SHH* e *SMO*, codificadas por genes homônimos, além de uma verdadeira família de fatores de transcrição, denominados *GLI* (EPSTEIN, 2008; KIM *et al.*, 2009; VERED *et al.*, 2009). Mutações no gene *PTCH* resultam na ativação da via de sinalização anteriormente descrita, culminando no aumento da transcrição de diversos genes-alvo, como os envolvidos na regulação do ciclo celular e da apoptose e os relacionados à determinação do destino celular (KAWAGISHI *et al.*, 2018).

Os COs correspondem a aproximadamente 11,7% dos cistos odontogênicos (JOHNSON *et al.*, 2014). Apesar de apresentar uma frequência relativamente baixa, quando comparada aos outros cistos odontogênicos, essa lesão se destaca pelo padrão de crescimento infiltrativo em meio ao osso trabecular dos maxilares, sem causar expansão óssea significativa em fases iniciais, e pela tendência ao desenvolvimento de recorrências (CUNHA *et al.*, 2016; FLORINDO *et al.*, 2017; HWANG *et al.*, 2018).

A maioria dos casos é diagnosticada em indivíduos do sexo masculino, com média de idade de 38,6 anos (DE CASTRO *et al.*, 2017). A mandíbula é o sítio anatômico mais acometido, principalmente a região posterior e o ramo ascendente, e alguns casos podem estar relacionados a dentes inclusos. De modo geral, os COs são assintomáticos e, por consequência, são diagnosticados nos exames radiográficos de rotina. Porém, alguns casos podem apresentar aumento de volume, sensibilidade local e, quando secundariamente infectados, exsudato purulento e trismo (CUNHA *et al.*, 2016; JAEGER *et al.*, 2017; HWANG *et al.*, 2018).

Radiograficamente, os COs se apresentam como uma lesão radiolúcida, unilocular ou multilocular, bem circunscrita, com margens regulares e frequentemente bem corticalizadas. Alguns casos podem exibir, ainda, deslocamento de dentes impactados ou erupcionados, bem como reabsorção radicular (DE CASTRO *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2018).

Ao exame histopatológico, o CO exibe uma cavidade patológica revestida por epitélio pavimentoso estratificado paracetrinizado, com 5 a 8 camadas de células de espessura, além de superfície corrugada (BORGHESI *et al.*, 2018). A camada basal apresenta células colunares baixas ou cúbicas, dispostas em paliçada, com núcleos hiper cromáticos. Em alguns casos, podem ser observados conspícuos brotamentos epiteliais a partir da camada basal. No lúmen cístico, destaca-se a presença de ceratina em quantidade variável. A cápsula fibrosa circunvizinha, por sua vez, é relativamente delgada e não demonstra infiltrado inflamatório apreciável. Podem ser identificados, com frequência variável, cistos-satélites, ilhas de epitélio

odontogênico e calcificações distróficas (WOO, 2012; DE CASTRO *et al.*, 2017; BORGHESI *et al.*, 2018).

Os COs possuem taxas de recorrência relativamente altas em comparação a outras lesões císticas odontogênicas (BORGHESI *et al.*, 2018). Dessa forma, os tratamentos propostos para essas lesões estão voltados à redução do risco de recorrência, minimizando, ao mesmo tempo, a morbidade para o paciente (DE CASTRO *et al.*, 2017; BORGHESI *et al.*, 2018). Dentre os tratamentos conservadores, estão incluídas a marsupialização, a descompressão e a enucleação com curetagem (HWANG *et al.*, 2018). Em uma revisão sistemática, De Castro *et al.* (2017) verificaram uma superioridade significativa de sucesso para os tratamentos de CO que usam descompressão seguida de enucleação, em vez de apenas enucleação.

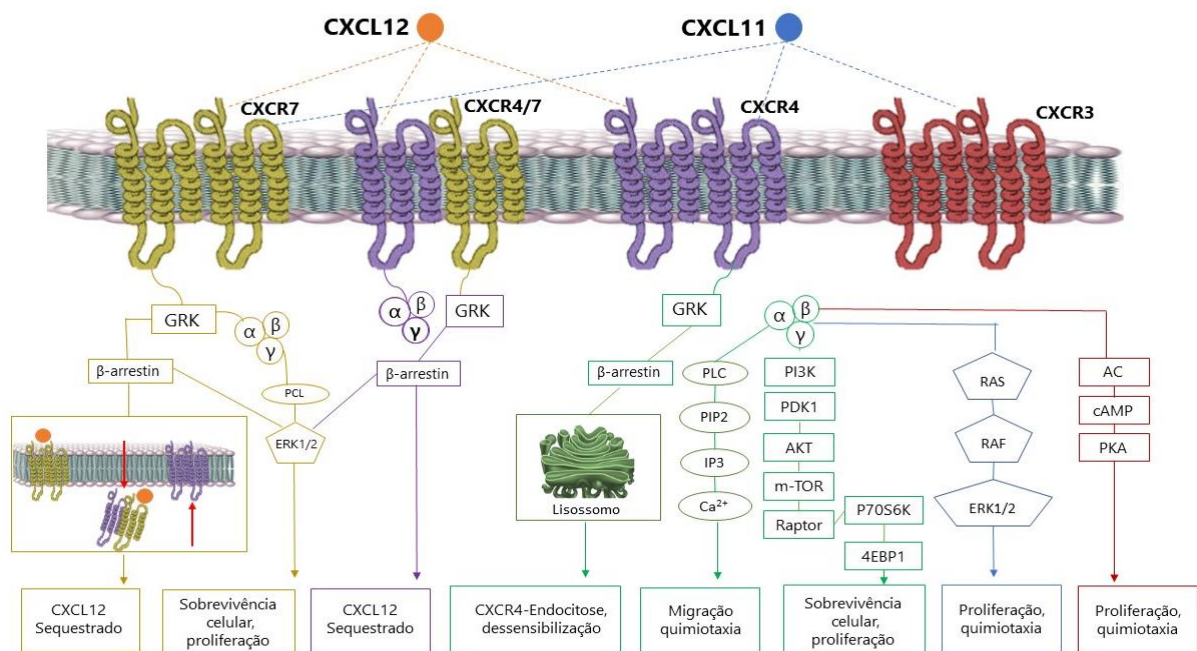
No intuito de esclarecer as diferenças na patogênese e no comportamento biológico dos CRs, CDs e COs, estudos têm analisado o envolvimento de diferentes moléculas e processos, como os relacionados à angiogênese (DE ANDRADE SANTOS *et al.*, 2011), à proliferação celular (GADBAIL *et al.*, 2009; COȘARCĂ *et al.*, 2016; KECHIK; SIAR, 2018) e à degradação de peptídeos biologicamente ativos (ALI *et al.*, 2019). Nesse cenário, investigações também revelaram que um grupo particular de citocinas, designadas quimiocinas, poderia ser importante na patogênese de cistos odontogênicos inflamatórios, como os CRs (BANDO *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2005; MUGLALI *et al.*, 2008; DEZEREGA *et al.*, 2010; MARÇAL *et al.*, 2010). Entretanto, até o momento, pouco se sabe sobre uma eventual participação destas proteínas na patogênese dos cistos odontogênicos de desenvolvimento, como CDs e COs (TAKATA; YOKOO; KOMORI 2011; KOLOKYTHAS *et al.*, 2012).

As quimiocinas são citocinas quimioatrativas, com peso molecular que varia de 8 a 10kDa (MILLER; MAYO, 2017), que ligam-se a receptores heterotriméricos de superfície celular acoplados à proteína G (KIM *et al.*, 2014; SCALA, 2015; ZIAREK *et al.*, 2017). De acordo com o arranjo e o número de resíduos de cisteína na extremidade N-terminal, essas citocinas podem ser classificadas em quatro subfamílias principais (C, CC, CXC e CX3C) (MILLER; MAYO, 2017; JANSSENS *et al.*, 2018). Dentre essas subfamílias, as quimiocinas CXC e seus respectivos receptores têm despertado particular interesse no âmbito da investigação científica por se mostrarem envolvidos em diversos processos, com destaque para a inflamação e a imunidade antitumoral (FIGURA 1) (CABRERO-DE LAS HERAS; MARTÍNEZ-BALIBREA; 2018).

Assim, respostas típicas de quimiocinas mediadas pela atividade da proteína G não são geradas após a ligação ao ligante (SINGH *et al.*, 2013; SCALA, 2015).

A reação de transdução do CXCR4 através da CXCL12 é realizada por meio de uma complexa via de sinalização (FIGURA 2) (JIANG *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014; SCALA, 2015; JANSSENS *et al.*, 2018). Embora as pesquisas sobre a expressão da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 em lesões odontogênicas sejam escassas, as evidências obtidas revelam uma participação significativa em processos relacionados ao desenvolvimento de lesões periapicais de origem inflamatória, incluindo CRs (FUKADA *et al.*, 2009; CAVALLA *et al.*, 2013).

Figura 2. Vias de transdução ativadas pela interação de CXCL12 e CXCL11 com os receptores CXCR4 e CXCR7.



Fonte: Adaptado de Scala (2015).

A proteína CXCL12 atua como um coativador em respostas imunes em órgãos linfoides secundários (BRUNN *et al.*, 2013). É constitutivamente expressa em células endoteliais e células derivadas da medula óssea (NAGASAWA *et al.*, 1996; RICHTER *et al.*, 2014) e pode estimular a migração, sobrevivência e proliferação celulares (ZILKHA-FALB *et al.*, 2016). Esta quimiocina exerce forte influência sobre a migração de linfócitos e macrófagos e está diretamente implicada na migração de células hematopoiéticas para a medula óssea, na

angiogênese e na organização do sistema nervoso (ZILKHA-FALB *et al.*, 2016; KIRCHER *et al.*, 2018).

Poucas pesquisas relacionam a expressão de quimiocinas e seus receptores em lesões císticas odontogênicas. Destacam-se, neste cenário, os estudos realizados em CRs (BANDO *et al.* 1993; SILVA *et al.*, 2005; MUGLALI *et al.*, 2008; FUKADA *et al.*, 2009; DEZEREGA *et al.*, 2010; MARÇAL *et al.*, 2010; CAVALLA *et al.*, 2013) e, em menor número, os desenvolvidos com CDs e COs (TAKATA; YOKOO; KOMORI, 2011; KOLOKYTHAS *et al.*, 2012).

Em um dos estudos pioneiros sobre quimiocinas em cistos odontogênicos, Bando *et al.* (1993) avaliaram a expressão de interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral (TNF) em CRs (n = 12). Além dessas proteínas, os autores analisaram as expressões da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e da molécula de adesão leucocitária endotelial-1 (ELAM-1). Foi constatada imunomarcagem para IL-1 α , IL-1 β e IL-6 em células endoteliais e no revestimento epitelial das lesões. Além disso, uma proporção significativa dos vasos sanguíneos dos CRs se apresentaram em estado ativo, caracterizado pela expressão de ELAM-1 e ICAM-1 nas células endoteliais. De acordo com Bando *et al.* (1993), IL-1 α , IL-1 β e IL-6 podem ser moléculas importantes para estimular a ativação dos vasos sanguíneos nos CRs.

Silva *et al.* (2005), em estudo envolvendo reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e imunistoquímica, analisaram a presença de linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 e macrófagos, bem como as expressões de IL-8 e de receptores de quimiocinas envolvidos nas respostas Th1 (CCR1, CCR5 e CXCR3) e Th2 (CCR2 e CCR3), em granulomas periapicais (n = 13) e CRs (n = 5). Dentre os resultados obtidos, destaca-se uma maior expressão de CCR3 ($p = 0,008$), CCR5 ($p = 0,030$), CXCR1 ($p = 0,033$) e CXCR3 ($p = 0,004$) nos CRs quando comparados aos granulomas periapicais. Dessa forma, Silva *et al.* (2005) propõem que esses receptores de quimiocinas podem estar envolvidos no desenvolvimento dos CRs.

Por sua vez, Muglali *et al.* (2008) avaliaram, por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), os níveis de IL-1 α , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e RANTES nos fluidos da cavidade cística de CRs (n = 11) e cistos residuais (n = 10). Em comparação com os fluidos coletados das cavidades de cistos residuais, aqueles obtidos a partir de CRs exibiram concentrações significativamente maiores de IL-1 α ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,001$), RANTES ($p < 0,001$) e MCP-1 ($p < 0,01$). Considerando que

essas citocinas estão envolvidas na expansão dessas lesões, Muglali *et al.* (2008) sugeriram que os CRs apresentam um maior potencial de crescimento quando comparados aos cistos residuais.

Em pesquisa envolvendo *Western blot* e imunoistoquímica, Dezerega *et al.* (2010) examinaram a expressão da quimiocina CCL-7 em CRs (n = 5) e granulomas periapicais (n = 7), bem como em casos de periodontite apical sintomática (n = 14) e assintomática (n = 14). Foi constatada expressão de CCL-7 em CRs e granulomas periapicais, localizada principalmente em células inflamatórias, bem como no exsudato periapical. Segundo Dezerega *et al.* (2010), os níveis de expressão de CCL-7 foram significativamente maiores na periodontite apical sintomática do que na assintomática, e sugere que esta quimiocina pode desempenhar um papel na patogênese das lesões periapicais, possivelmente estimulando a quimiotaxia mononuclear.

Marçal *et al.* (2010) analisaram a natureza do infiltrado inflamatório, a presença de mastócitos e de células T regulatórias (Treg) e a expressão *in situ* de citocinas (interleucina-17 [IL-17] e fator transformador de crescimento- β [TGF- β]) e quimiocinas (proteína inflamatória de macrófagos-1 β [MIP-1 β] e MCP-1) em CRs (n = 25) e granulomas periapicais (n = 25). Os resultados revelaram maior infiltrado inflamatório mononuclear nos CRs ($p = 0,04$) e maior quantidade de mastócitos nos granulomas periapicais ($p = 0,02$). De acordo com Marçal *et al.* (2010), lesões periapicais crônicas podem apresentar um processo de reagudização que está relacionado com um aumento da infiltração leucocitária, com o predomínio de neutrófilos, bem como pelo aumento da expressão de IL-17.

Sob outra perspectiva, em estudo envolvendo análises por PCR, imunoistoquímica e cromatografia gasosa, Takata, Yokoo e Komori (2011) investigaram diferenças citobiológicas entre ceratinócitos de CDs e CRs. Os autores observaram maiores expressões de fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófago (GM-CSF) e de beta-defensina humana 2 (HBD-2), além de maiores quantidades de linfócitos T CD4 nos CRs, quando comparados aos CDs. Nessas lesões, as células de Langerhans foram os principais tipos celulares positivos para o receptor de quimiocina 6 (CCR6). Em comparação com a mucosa oral normal, o revestimento epitelial das lesões císticas apresentou menor expressão de GM-CSF e HBD-2, além de uma menor quantidade de células de Langerhans. De acordo com Takata, Yokoo e Komori (2011), o revestimento epitelial dos CDs e CRs possuiria um sistema de defesa imaturo, comparado ao epitélio da mucosa oral normal.

No intuito de determinar se o perfil de citocinas, em material obtido por aspiração, pode auxiliar no diagnóstico de lesões odontogênicas, Kolokythas *et al.* (2012) avaliaram a expressão de 16 citocinas, incluindo diversas interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-

10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17 e IL-23), interferon-gama (IFN- γ), TNF- α e fator de necrose tumoral- β (TNF- β) em COs, ameloblastomas e CDs. Os dados, analisados com auxílio do *Q-Plex™ Human Cytokine-Screen*, revelaram possíveis combinações entre os níveis de expressão de citocinas que auxiliariam no diagnóstico dessas lesões. Neste sentido, COs estariam caracterizados por altas proporções IL-8/IL-4, TNF- α /TNF- β , TNF- α /IL-8 e IL-13/IL-15. Por sua vez, CDs apresentariam altas proporções IL-5/IL-1 α , IL-5/IL-12, IL-23/IL-1 α e IL-23/TNF- α . Para Kolokythas *et al.* (2012), a análise conjunta dos níveis de expressão de determinadas citocinas em material obtido por aspiração poderia auxiliar no diagnóstico de CDs, COs e ameloblastomas.

Poucos estudos analisaram a expressão da quimiocina CXCL12 em cistos odontogênicos (FUKADA *et al.*, 2009; CAVALLA *et al.*, 2013). Destaca-se, nesse contexto, a pesquisa realizada por Fukada *et al.* (2009). Os autores avaliaram a expressão de CXCL12, bem como a quantidade de células Treg e células T auxiliares tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) em gengiva saudável (n = 8), granulomas periapicais (n = 20) e CRs (n = 10) através do método PCR em tempo real. Os resultados revelaram uma maior expressão de CXCL12 nos CRs e um maior estímulo à atividade osteoclástica nos granulomas periapicais, caracterizada pelo predomínio da resposta Th1 nestas lesões. De acordo com Fukada *et al.* (2009), desequilíbrios entre atividades osteoclásticas e respostas imunes celulares, possivelmente regulados de forma crítica por células Treg, poderiam contribuir para o desenvolvimento dos granulomas periapicais e CRs.

Por sua vez, Cavalla *et al.* (2013) avaliaram a imunoexpressão de CXCL12 em granulomas periapicais (n = 3), CRs (n = 3) e espécimes de gengiva saudável (n = 3). Por citometria de fluxo, esses autores também verificaram a expressão dessa quimiocina em diferentes populações de células imunes, incluindo células dendríticas maduras (CD1a+), linfócitos T auxiliares (CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD8+), monócitos/ macrófagos (CD14+), neutrófilos (16b+), linfócitos B (CD19+), células *Natural Killer* (CD56+), células dendríticas ativadas (CD84+) e mastócitos (CD117+). Os resultados demonstraram que os mastócitos eram os principais tipos celulares que expressavam CXCL12 nas lesões periapicais, seguidos por linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. De acordo com Cavalla *et al.* (2013), a quimiocina CXCL12 pode desempenhar um papel central na destruição tecidual em lesões periapicais, provavelmente induzindo o recrutamento persistente de células imunes, particularmente de mastócitos.

Embora as evidências sugiram uma importante participação da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 na patogênese de cistos odontogênicos inflamatórios, até o momento, pouco se sabe sobre a expressão dessas proteínas em cistos odontogênicos de desenvolvimento.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da imunohistoquímica, a expressão das proteínas CXCL12 e CXCR4 em CRs, CDs e COs.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar e descrever os dados clínicos das lesões em estudo;
 - Analisar a frequência de brotamentos epiteliais e cistos satélites nos COs;
 - Classificar os casos de CR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório e o padrão do revestimento epitelial;
 - Determinar os percentuais de células imunopositivas para CXCL12 e CXCR4 no componente epitelial e na cápsula fibrosa das lesões;
 - Relacionar as imunorexpressões das proteínas CXCL12 e CXCR4 com as características morfológicas dos COs (brotamentos epiteliais e cistos satélites) e dos CRs (intensidade do infiltrado inflamatório e espessura do revestimento epitelial);
 - Estabelecer correlações entre as imunorexpressões das proteínas nos CRs, CDs e COs.
-

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

Esta pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 3.339.761 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

3.2 Caracterização do estudo

A pesquisa desenvolvida consistiu em um estudo do tipo observacional, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunorexpressões da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em CRs, CDs e COs.

3.3 População

A população do estudo foi constituída por todos os casos de CR, CD e CO, diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB e no Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.4 Amostra

A amostra do estudo, obtida por conveniência, foi constituída por 60 casos fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina, obtidos a partir dos registros dos serviços citados anteriormente. 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 CR, CD e CO que apresentavam 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 (CRs, CDs e COs), 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 apresentavam, após

análise histopatológica, secundariamente inflamados. Casos de CO associados à síndrome de Gorlin 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 dependentes e independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
Imunoexpressão de CXCL12	Percentual de células positivas	- Epitélio: citoplasma - Cápsula: citoplasma	Dependente
Imunoexpressão de CXCR4	Percentual de células positivas	- Epitélio: citoplasma e núcleo - Cápsula: citoplasma e núcleo	Dependente
Tipo de lesão	Classificação da lesão cística de acordo com sua origem e características histopatológicas	- Cisto radicular - Cisto dentígero - Ceratocisto odontogênico	Independente
Infiltrado inflamatório	Classificação do CR de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório	- Grau I - Grau II - Grau III	Independente
Revestimento epitelial	Classificação do CR de acordo com o padrão predominante de revestimento epitelial	- Atrófico - Hiperplásico	Independente
Brotamentos epiteliais	Projeções epiteliais bulbosas a partir da camada basal em direção à cápsula fibrosa dos COs.	- Presente - Ausente	Independente
Cistos satélites	Estruturas microcísticas na cápsula fibrosa dos COs.	- Presente - Ausente	Independente

3.6 Estudo clínico

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

3.7 Estudo morfológico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida 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 e COs.

Nos CRs foram analisados a intensidade do infiltrado inflamatório na cápsula fibrosa e o padrão do revestimento epitelial. A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com os critérios de Peixoto *et al.* (2012). A partir da porção luminal dos CRs em direção à periferia, foi considerado 1 campo microscópico, sob aumento de 200×. Os espécimes cujo infiltrado se apresentou restrito a um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I; as lesões com células inflamatórias presentes em até dois terços foram definidas como de grau II; e as lesões que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços foram categorizadas como de grau III (APÊNDICE A).

Nos CRs, também foi analisado o padrão do revestimento epitelial, seguindo a metodologia proposta por Moreira *et al.* (2000) (APÊNDICE A). 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 a cápsula e o revestimento epitelial. Por sua vez, foram considerados como hiperplásicos, os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, que possuem mais de 10 camadas de células e interface arciforme entre a cápsula e o revestimento epitelial.

Especificamente para os COs, os casos foram analisados quanto à presença ou ausência de cistos satélites e de brotamentos epiteliais em direção ao tecido conjuntivo subjacente (MYOUNG *et al.*, 2001) (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 organosilano (3-aminopropiltrietoxisilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe PlusTM*, Advanced Biosystems Inc.,

Redwood, CA, USA), utilizando anticorpos monoclonais anti-CXCL12 e anti-CXCR4 (QUADRO 2).

Quadro 2. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários.

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
CXCL12	P-159X	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
CXCR4	12G5	Santa Cruz Biotechnology	1:750	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 60 min	60 minutos

Como controle positivo para os anticorpos anti-CXCL2 e anti-CXCR4, foram utilizados espécimes de tonsila. O controle negativo, por sua vez, consistiu na omissão do anticorpo primário no protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- ⇒ Reidratação em cadeia decrescente 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) (7 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (2,5 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 CXCL12 e CXCR4 foi realizada, tanto no componente epitelial como na cápsula fibrosa dos CRs, CDs e COs, com base em uma

adaptação da metodologia utilizada no estudo de Brito *et al.* (2018). Para a proteína CXCL12, foi avaliada apenas a imunorreatividade em citoplasma. Por sua vez, a imunexpressão de CXCR4 foi analisada, 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 e 10 campos da cápsula fibrosa imediatamente abaixo do tecido 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, tanto para o componente epitelial quanto para a cápsula fibrosa (APÊNDICE B).

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 SPSS Inc., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para CXCL12 e CXCR4 foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para CXCL12 e CXCR4, de acordo com os grupos de lesões e as características histopatológicas dos CRs. Possíveis correlações entre as imunexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. 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: “**Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos**”.

O referido artigo será submetido ao periódico *International Endodontic Journal* (INSSN: 1365-2591, Fator de impacto: 3.331, Qualis Odontologia: A1), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

4.2 Artigo a ser submetido

Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em cistos radiculares, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos

Título breve: **CXCL12 e CXCR4 em cistos odontogênicos**

Allany de Oliveira Andrade¹, Ricardo Alves de Mesquita², Manuel Antonio Gordón-Núñez¹, Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹

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

²*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.*

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 immunoexpressions of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 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) and OKCs (satellite cysts and epithelial budding).

Methodology: Twenty RCs, 20 DCs, and 20 OKCs were submitted to immunohistochemistry. The percentages of cytoplasmic (CXCL12 and CXCR4) and nuclear (CXCR4) staining in epithelial and connective tissue cells were determined. The results were analyzed statistically using the nonparametric Mann-Whitney and Spearman correlation tests ($P < 0.05$).

Results: In epithelial tissue, RCs and DCs exhibited higher expression of CXCL12 than OKCs ($P < 0.05$). The expression of CXCL12 in connective tissue was higher in DCs than in RCs and OKCs ($P < 0.05$). Regarding CXCR4, there was higher cytoplasmic expression in epithelial tissue and fibrous capsule of RCs and DCs than in OKCs ($P < 0.05$). In connective tissue, there was higher nuclear expression of CXCR4 in DCs than in OKCs ($P < 0.05$). No significant differences in the immunoexpression of CXCL12 and CXCR4 were observed for any of the morphological parameters ($P > 0.05$). Positive correlations were observed between cytoplasmic and nuclear expression of CXCR4 in epithelial tissue of RCs and DCs, and in fibrous capsule of all three cyst groups ($P < 0.05$). In fibrous capsule of RCs, expression of CXCL12 and nuclear expression of CXCR4 were positively correlated ($P < 0.05$).

Conclusions: The results suggest an important participation of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in the pathogenesis of RCs, DCs, and OKCs. These proteins may be particularly relevant in the development of odontogenic cysts with less aggressive biological behavior.

Keywords: radicular cyst, dentigerous cyst, odontogenic keratocyst, CXCL12, CXCR4.

Introdução

No contexto dos cistos odontogênicos, que incluem 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 apresentarem as maiores prevalências (Johnson *et al.*, 2014; El-Naggar *et al.* 2017). Além de constituírem os cistos odontogênicos mais frequentes dos ossos gnáticos, CRs, CDs e COs apresentam diferenças importantes em relação à histogênese e ao comportamento biológico (Gadbail *et al.* 2009; de Andrade Santos *et al.* 2011; Santos Netto *et al.* 2012; Kechik & Siar 2018; Ali *et al.* 2019).

Apesar dos avanços no conhecimento da patogênese dessas lesões, com estudos destacando o envolvimento de diferentes moléculas, como aquelas relacionadas à angiogênese (de Andrade Santos *et al.* 2011), à degradação de peptídeos biologicamente ativos (Ali *et al.* 2019), à hipóxia (da Costa *et al.* 2018) e à proliferação e migração celulares (Gadbail *et al.* 2009; Kechik & Siar 2018), esse processo permanece incompletamente compreendido. Nesse cenário, investigações revelaram que um grupo particular de citocinas, designadas quimiocinas, podem estar envolvidas na patogênese de CRs, CDs e COs (Silva *et al.* 2005; Fukada *et al.* 2009; Dezerega *et al.* 2010; Marçal *et al.* 2010; Takata *et al.* 2011; Kolokythas *et al.* 2012).

As quimiocinas são citocinas quimioatrativas, com peso molecular que varia de 8 a 10kDa, capazes de interagir com receptores heterotriméricos de superfície celular acoplados à proteína G (Scala 2015; Miller & Mayo 2017; Ziarek *et al.* 2017). De acordo com o arranjo e o número de resíduos de cisteína na extremidade N-terminal, essas citocinas podem ser classificadas em quatro subfamílias principais (C, CC, CXC e CX3C) (Miller & Mayo 2017; Janssens *et al.* 2018). Dentre os diversos membros dessas subfamílias, destaca-se a quimiocina CXCL12 e seus receptores CXCR4 e CXCR7 (Scala 2015). Embora ambos sejam receptores transmembrana de superfície celular acoplados à proteína G, CXCR7 se apresenta como um receptor atípico de quimiocinas, incapaz de mediar a sinalização convencional e estimular a migração celular (Singh *et al.* 2013; Scala 2015; Janssens *et al.* 2016).

Por meio de sua interação com CXCR4, a quimiocina CXCL12 atua como coativadora de respostas imunes em órgãos linfoides secundários (Brunn *et al.* 2013) e estimula a migração, sobrevivência e proliferação de tipos celulares diversos, incluindo células dendríticas (Kabashima *et al.* 2007), células endoteliais (Takabatake *et al.* 2009), fibroblastos (Lin *et al.* 2014) células epiteliais (Agle *et al.* 2011) e células inflamatórias, como linfócitos (Janssens *et al.* 2016) e macrófagos (Yu *et al.* 2018). Além disso, essa citocina quimioatrativa está envolvida na migração de células hematopoiéticas para a medula óssea e na angiogênese (Zilkha-Falb *et al.* 2016; Kircher *et al.* 2018).

Apesar dos importantes papéis desempenhados por CXCL12 e CXCR4 em processos biológicos diversos, até o momento, pouco se sabe sobre a participação destas proteínas na patogênese de CRs, CDs e COs. Em particular, os poucos estudos publicados sugerem que a quimiocina CXCL12 poderia contribuir para o desenvolvimento de CRs (Fukada *et al.* 2009), possivelmente por induzir o recrutamento persistente de células imunes (Cavalla *et al.* 2013). Desse modo, o presente estudo se propôs a avaliar a imunexpressão da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 em CRs, CDs e COs. Pretendeu-se, com esta pesquisa, contribuir para uma melhor compreensão da patogênese e do comportamento biológico dessas lesões.

Materiais e Métodos

Espécimes

Sessenta casos de cistos odontogênicos, incluindo 20 CRs, 20 CDs e 20 COs, obtidos nos Laboratórios de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram selecionados para este estudo. O diagnóstico histopatológico das lesões foi confirmado, por um patologista oral experiente, com base na quarta classificação dos cistos odontogênicos da Organização Mundial da Saúde (El-Naggar *et al.* 2017). Casos provenientes de biópsia incisional ou submetidos previamente à descompressão foram excluídos da amostra. Casos de CD e CO secundariamente inflamados, bem como COs associados à síndrome de Gorlin também foram excluídos do estudo. Para todos os casos de CRs, CDs e COs, 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 casos é apresentada na Tabela 1. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEPB (Parecer nº 3.339.761).

Análise morfológica

Os casos de CR e CO, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes com 5µm de espessura. Subsequentemente, os cortes histológicos foram corados em hematoxilina e eosina e examinados sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por um patologista oral experiente.

Nos CRs foram analisados a intensidade do infiltrado inflamatório na cápsula fibrosa e o padrão do revestimento epitelial. A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada a partir da porção luminal dos CRs em direção à periferia, considerando-se 1 campo microscópico sob aumento de 200×. Lesões com infiltrado inflamatório restrito a um terço do campo

microscópico foram classificadas em grau I, lesões com células inflamatórias presentes em até dois terços foram definidas como de grau II e casos que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços do campo microscópico foram classificados como de grau III (Peixoto *et al.* 2012).

O padrão do revestimento epitelial nos CRs foi determinado com base no tipo predominante em cada caso. Cistos predominantemente revestidos por epitélio com 2 a 10 camadas de células de espessura e que exibe interface plana entre a cápsula e o revestimento epitelial foram classificados como atróficos. Por sua vez, CRs revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células e interface arciforme entre a cápsula e o revestimento epitelial, foram classificados como hiperplásicos (Moreira *et al.* 2000).

Em relação aos COs, os casos foram analisados quanto à presença ou ausência de cistos satélites e de brotamentos epiteliais em direção à cápsula fibrosa (Myoung *et al.* 2001).

Imunoistoquímica

A partir do material fixado em formol e emblocado 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). Em sequência, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após incubação com anticorpos primários monoclonais anti-CXCR4 e anti-CXCL12 (Tabela 2), os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros (*Immunohistoprobe PlusTM*, 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), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com lamínula. Cortes histológicos de tonsila foram utilizados como controle positivo para os anticorpos anti-CLXC12 e anti-CXCR4. 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). Para todos os anticorpos, foram avaliadas as imunoexpressões no revestimento epitelial e na cápsula

fibrosa das lesões. Para a proteína CXCL12, foi avaliada a imunorreatividade citoplasmática. Por sua vez, para CXCR4, as análises foram realizadas, separadamente, para as imunorexpressões citoplasmática e nuclear.

Para a análise da imunexpressão de CXCL12 e CXCR4 foi adaptada a metodologia utilizada no estudo de Brito *et al.* (2018). Sob aumento de 100×, foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos. Em sequência, sob aumento de 400×, dez campos do revestimento epitelial e 10 campos da cápsula fibrosa, localizados imediatamente abaixo do tecido epitelial, foram fotomicrografados (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para o 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 fotomicrografados. Em sequência, para cada um dos anticorpos, foi estabelecido o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas.

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 foram analisados por meio do teste Shapiro-Wilk, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para CXCL12 e CXCR4, de acordo com o tipo de lesão e as características histopatológicas dos CRs. Possíveis correlações entre as imunorexpressões de CXCL12 e CXCR4 foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Resultados

Análise morfológica

A análise da intensidade do infiltrado inflamatório nos CRs revelou 13 (65,0%) casos classificados em grau III, 5 (25,0%) casos em grau II e 2 (10,0%) casos em grau I. Por sua vez, a análise do revestimento epitelial revelou 11 (55,0%) casos de CR com epitélio hiperplásico e 9 (45,0%) casos com epitélio atrófico.

Em relação aos COs, não foram constatados cistos satélites ou brotamentos epiteliais em nenhum dos casos avaliados no presente estudo.

Análise imunoistoquímica

Imunoexpressão de CXCL12

No revestimento epitelial, foi observada imunoexpressão de CXCL12 em todos os casos de CR e CD, bem como na maioria dos COs (95,0%; $n = 19$) avaliados no presente estudo (Fig. 1A – C). A análise dos percentuais de positividade para essa quimiocina revelou imunoexpressão significativamente inferior nos COs (mediana: 9,2%; variação: 0,0% – 76,3%) quando comparados aos CRs (mediana: 38,8%; variação: 6,0% – 93,9%) ($P = 0,001$) e CDs (mediana: 73,0%; variação: 6,9% – 99,0%) ($P < 0,001$) (Fig. 2A). Por sua vez, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade para CXCL12 entre CRs e CDs ($P = 0,066$) (Fig. 2A).

Na cápsula fibrosa, foi observada expressão de CXCL12 em todos os CRs, CDs e COs avaliados, com positividade em células inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais (Fig. 1A – C). A análise dos percentuais de imunopositividade para essa quimiocina revelou expressão significativamente superior nos CDs (mediana: 26,0%; variação: 4,0% – 85,7%) quando comparados aos COs (mediana: 17,3%; variação: 1,3% – 41,5%) ($P = 0,042$) e CRs (mediana: 7,5%; variação: 0,1% – 73,9%) ($P = 0,004$) (Fig. 2A). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade para CXCL12 entre CRs e COs ($P = 0,110$) (Fig. 2A).

Em relação aos aspectos histopatológicos dos CRs (padrão do revestimento epitelial e intensidade do infiltrado inflamatório), não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunoexpressão de CXCL12, tanto no revestimento epitelial quanto na cápsula fibrosa das lesões ($P > 0,05$) (Tabela 3).

Imunoexpressão de CXCR4

No revestimento epitelial, foi observada imunoexpressão citoplasmática de CXCR4 em todos os casos de CR, CD e CO avaliados no presente estudo (Fig. 3A – C). A análise dos percentuais de positividade para esse receptor de quimiocina revelou imunoexpressão significativamente inferior nos COs (mediana: 0,3%; variação: 0,1% – 96,1%) quando comparados aos CRs (mediana: 98,9%; variação: 5,6% – 100,0%) ($P < 0,001$) e CDs (mediana: 94,7%; variação: 2,8% – 100,0%) ($P < 0,001$) (Fig. 2B). Por sua vez, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade citoplasmática para CXCR4 entre CRs e CDs ($P = 0,246$) (Fig. 2B).

A análise da imunoexpressão nuclear de CXCR4 no revestimento epitelial das lesões revelou positividade em todos os casos de CO e CD, bem como na maioria dos CRs (95,0%; n

= 19) avaliados (Fig. 3A – C). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade nuclear para CXCR4 entre CRs (mediana: 39,9%; variação: 0,0% – 80,3%), CDs (mediana: 53,3%; variação: 0,1% – 91,2%) e COs (mediana: 48,9%; variação: 9,9% – 79,7%) ($P > 0,05$) (Fig. 2C).

Na cápsula fibrosa, foi constatada imunopositividade citoplasmática para CXCR4 em todos os CRs, CDs e COs analisados, principalmente em células inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais (Fig. 3A – C). A análise dos percentuais de positividade para esse receptor de quimiocina revelou imunopositividade significativamente inferior nos COs (mediana: 2,6%; variação: 0,1% – 76,1%) quando comparados aos CRs (mediana: 15,2%; variação: 0,3% – 95,9%) ($P = 0,022$) e CDs (mediana: 13,8%; variação: 8,9% – 67,8%) ($P = 0,007$) (Fig. 2B). Por sua vez, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade citoplasmática para CXCR4 entre CRs e CDs ($P = 0,579$) (Fig. 2B).

A análise da imunopositividade nuclear de CXCR4 na cápsula fibrosa das lesões revelou positividade em todos os casos de CR e CD, bem como na maioria dos COs (95,0%, $n = 19$) avaliados (Fig. 3A – C). Foram constatados percentuais de imunopositividade significativamente superiores nos CDs (mediana: 16,1%; variação: 0,9% – 47,4%) quando comparados aos COs (mediana: 2,9%; variação: 0,0% – 63,4%) ($P = 0,007$). Por sua vez, não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de imunopositividade nuclear para CXCR4 nos CRs (mediana: 7,7%; variação: 0,1% – 49,9%) em relação aos CDs e COs ($P > 0,05$) (Fig. 2C).

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 imunopositividade citoplasmática e nuclear de CXCR4, tanto no revestimento epitelial quanto na cápsula fibrosa ($P > 0,05$) (Tabela 3).

Correlação entre as imunopositividades de CXCL12 e CXCR4

As correlações entre as imunopositividades de CXCL12 e CXCR4 nos CRs, CDs e COs estão sumarizadas na Tabela 4. No grupo dos CRs, foi observada correlação positiva entre as imunopositividades citoplasmática e nuclear de CXCR4 no revestimento epitelial ($r = 0,597$; $P = 0,005$). Além disso, na cápsula fibrosa dessas lesões, a imunopositividade nuclear de CXCR4 apresentou correlação positiva com a expressão de CXCL12 ($r = 0,523$; $P = 0,018$) e com a expressão citoplasmática de CXCR4 ($r = 0,555$; $P = 0,011$). Nos CDs, foi identificada correlação positiva entre as imunopositividades citoplasmática e nuclear de CXCR4, tanto no revestimento epitelial ($r = 0,678$; $P = 0,001$) quanto na cápsula fibrosa ($r = 0,937$; $P < 0,001$).

No grupo dos COs, foi constatada correlação positiva entre as imunorexpressões citoplasmática e nuclear de CXCR4 na cápsula fibrosa ($r = 0,796$; $P < 0,001$).

Discussão

Diversos estudos têm ressaltado o envolvimento da via de sinalização CXCL12-CXCR4 em processos patológicos, com destaque para doenças imunoinflamatórias (Janssens; Struyf; Proost, 2018; Siegfried *et al.* 2020), mas informações a respeito da sua participação na patogênese de cistos odontogênicos são escassas. As poucas pesquisas publicadas nesse contexto sugerem que a via de sinalização CXCL12-CXCR4 poderia contribuir para o desenvolvimento de CRs (Fukada *et al.* 2009; Cavalla *et al.* 2013). Em consonância com esses achados, os resultados do presente estudo corroboram a participação de CXCL12 e CXCR4 na patogênese dos CRs e, adicionalmente, revelam que essas proteínas podem ser potencialmente importantes para o desenvolvimento de CDs e COs.

Estudos prévios com CRs avaliaram os níveis de expressão de CXCL12 e CXCR4, por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) (Fukada *et al.* 2009), e caracterizaram a expressão de CXCL12 em subpopulações de células do sistema imune (Cavalla *et al.* 2013). Tais pesquisas constataram maiores níveis de expressão de CXCL12 e CXCR4 nos CRs quando comparados aos grupos controle (gengiva/ ligamento periodontal saudável). De acordo com esses estudos, a via de sinalização CXCL12-CXCR4 poderia contribuir para o recrutamento persistente de células imunes (Cavalla *et al.* 2013) e para a diferenciação de osteoclastos nos CRs (Fukada *et al.* 2009).

Em concordância com os achados anteriormente descritos, na presente pesquisa, foi observada imunorexpressão de CXCL12 em diversos tipos celulares da cápsula fibrosa dos CRs, incluindo células inflamatórias e células endoteliais. No entanto, os maiores índices de positividade para essa quimiocina nos CRs foram observados no revestimento epitelial, ressaltando-o como uma importante fonte de CXCL12. Por meio da secreção dessa quimiocina, o revestimento epitelial dos CRs poderia estimular o recrutamento de células inflamatórias e a diferenciação de osteoclastos (Fukada *et al.* 2009; Cavalla *et al.* 2013; Yu *et al.* 2018), bem como modular as funções de outros tipos celulares presentes na cápsula fibrosa, como as células endoteliais (Takabatake *et al.* 2009; Janssens *et al.* 2018), contribuindo para o desenvolvimento dessas lesões. Considerando os altos percentuais de expressão citoplasmática de CXCR4, observados no revestimento epitelial dos CRs, pode-se sugerir um potencial efeito de CXCL12 sobre as próprias células epiteliais, modulando eventos como a proliferação celular e a adesão à matriz extracelular (Smith *et al.* 2005; Agle *et al.* 2011).

Em relação aos cistos odontogênicos de desenvolvimento avaliados no presente estudo, os CDs revelaram percentuais de imunopositividade para CXCL12 e CXCR4 superiores aos constatados nos COs, tanto no revestimento epitelial quanto na cápsula fibrosa. Deve-se destacar que os percentuais de positividade para CXCL12 nos CDs se mostraram superiores aos observados nos CRs. Além disso, os níveis de imunexpressão de CXCR4 se mostraram similares em CDs e CRs. Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão de CXCL12 e CXCR4 em cistos odontogênicos pode não estar relacionada à natureza da lesão (inflamatória ou de desenvolvimento) e que essas proteínas podem ser particularmente relevantes no desenvolvimento daqueles com comportamento biológico menos agressivo.

A quimiocina CXCL12 e o seu receptor CXCR4 poderiam contribuir para o desenvolvimento de CDs e COs por diversos mecanismos, alguns dos quais semelhantes aos propostos para os CRs. Nesse sentido, a via de sinalização CXCL12-CXCR4 poderia estimular eventos importantes na cápsula fibrosa dessas lesões, como a angiogênese (Takabatake *et al.* 2009; Janssens *et al.* 2018; Kircher *et al.* 2018), a diferenciação de osteoclastos (Fukada *et al.* 2009; Cavalla *et al.* 2013), a transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Lin *et al.* 2014) e a síntese de fatores que estimulam a deposição de componentes da matriz extracelular, como o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (Lin *et al.* 2014). No revestimento epitelial dos CDs e COs, a quimiocina CXCL12 poderia interagir com o receptor CXCR4 e modular eventos como a adesão à membrana basal e a proliferação e migração celulares (Smith *et al.* 2005; Agle *et al.* 2011).

Nos COs, a análise da imunexpressão de CXCR4 no revestimento epitelial revelou achados peculiares. Quando comparados aos CRs e CDs, esses cistos revelaram percentuais de positividade citoplasmática para CXCR4 significativamente inferiores. Por outro lado, os percentuais de positividade nuclear para esse receptor de quimiocina nos COs se mostraram relativamente similares aos observados nos CRs e CDs, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em conjunto, esses achados sugerem uma possível associação de CXCR4 com outros receptores de quimiocinas, como CXCR7 (Janssens *et al.* 2018; Murphy & Heusinkveld 2018), constituindo dímeros no revestimento epitelial dos COs. Sabendo-se que as formas das quimiocinas (monoméricas ou diméricas) e a composição dos receptores de quimiocinas podem resultar na ativação de diferentes vias de transdução de sinais, com efeitos pleiotrópicos (Cavalla *et al.* 2013; Groblewska; Litman-Zawadzaka; Mroczko, 2020), os resultados do presente estudo ressaltam a importância de novas investigações para avaliar essa família de citocinas e seus receptores nos COs.

A translocação nuclear de CXCR4 em células do revestimento epitelial e da cápsula fibrosa de CRs, CDs e COs, além das correlações positivas entre as imunorexpressões citoplasmáticas e nucleares desse receptor de quimiocina, observadas no presente estudo, são achados que merecem destaque. Informações sobre o processo de translocação e as funções nucleares de CXCR4 são relativamente escassas. A translocação nuclear desse receptor de quimiocina, por vezes com confirmação da funcionalidade da proteína, tem sido observada em células de neoplasias malignas, incluindo carcinomas renal e de próstata (Don-Salu-Hewage *et al.* 2013; Bao *et al.* 2019). Porém, um estudo recente identificou translocação nuclear de CXCR4 em culturas de fibroblastos especializados presentes no estroma da córnea, denominados ceratócitos corneanos (Zhu *et al.* 2020). De acordo com Zhu *et al.* (2020), a translocação nuclear de CXCR4, após interação com CXCL12, resultou na agregação celular e reversão fenotípica de miofibroblastos para ceratócitos corneanos. Tais achados enaltecem a necessidade de investigações direcionadas à análise do processo de translocação e das funções nucleares de CXCR4 em lesões odontogênicas.

Em relação aos parâmetros morfológicos dos CRs, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nas imunorexpressões de CXCL12 e CXCR4. Estudos têm sugerido que, nos CRs, a intensidade do infiltrado inflamatório estaria diretamente relacionada à estimulação antigênica (Santos *et al.* 2007) e o status do revestimento epitelial (atrófico ou hiperplásico) representaria um parâmetro morfológico capaz de indicar atividade/ inatividade de crescimento da lesão (Moreira *et al.* 2000). Com base nessas sugestões e na participação de CXCL12 e CXCR4 em processos imunoinflamatórios (Janssens; Struyf; Proost, 2018; Siegfried *et al.* 2020), na presente pesquisa, esperava-se identificar diferenças na expressão destas proteínas de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório e o status do revestimento epitelial nos CRs. No entanto, considerando as imunorexpressões de CXCL12 e CXCR4 nos CDs, em níveis similares ou superiores aos observados em CRs, os resultados deste estudo sugerem que a expressão destas proteínas não está relacionada às características morfológicas destes cistos odontogênicos inflamatórios. Nesse contexto, pesquisas com cistos odontogênicos de desenvolvimento secundariamente inflamados são necessárias para averiguar uma eventual influência da inflamação na expressão de CXCL12 e CXCR4 nessas lesões.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem uma importante participação da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 na patogênese de CRs, CDs e COs. Essas proteínas podem ser particularmente relevantes no desenvolvimento de cistos odontogênicos com comportamento biológico menos agressivo.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). RAM e CFWN são bolsistas de produtividade em pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflito de interesses

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesses.

Referências

Agle KA, Vongsa RA, Dwinell MB (2011) Chemokine stimulation promotes enterocyte migration through laminin-specific integrins. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* **301**, G968–80.

Ali A, Asif M, Ahmad B, Jamal S, Ali I, Khadim MT (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.

Bando Y, Henderson B, Meghii S *et al.* (1993) Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **22**, 221–7.

Bao Y, Wang Z, Liu B *et al.* (2019) A feed-forward loop between nuclear translocation of CXCR4 and HIF-1 α promotes renal cell carcinoma metastasis. *Oncogene* **38**, 881–95.

Brito LNS, de Lemos Almeida MMR, de Souza LB, Alves PM, Nonaka CFW, Godoy GP (2018) Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *Journal of Endodontics* **44**, 728–33.

Brunn A, Utermöhlen O, Mihelcic M *et al.* (2013) Differential effects of CXCR4-CXCL12- and CXCR7-CXCL12-mediated immune reactions on murine P0106–125-induced experimental autoimmune neuritis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **39**, 772–87.

Cabrero-de Las Heras S, Martínez-Balibrea E (2018) CXC family of chemokines as prognostic or predictive biomarkers and possible drug targets in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **24**, 4738–49.

Cavalla F, Reyes H, Vernal R *et al.* (2013) High levels of CXC ligand 12/stromal cell-derived factor 1 in apical lesions of endodontic origin associated with mast cell infiltration. *Journal of Endodontics* **39**, 1234–9.

da Costa NMM, de Siqueira AS, Ribeiro ALR *et al.* (2018) Role of HIF-1 α and CASPASE-3 in cystogenesis of odontogenic cysts and tumors. *Clinical Oral Investigations* **22**, 141–9.

de Andrade Santos PP, de Aquino AR, Oliveira Barreto A, de Almeida Freitas R, Galvão HC, de Souza LB (2011) Immunohistochemical expression of nuclear factor κ 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.

de Noronha Santos Netto JN, Pires FR, da Fonseca EC, Silva LE, de Queiroz Chaves Lourenço S (2012) Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **41**, 630–6.

Dezerega A, Osorio C, Mardones J (2010) Monocyte chemotactic protein-3: possible involvement in apical periodontitis chemotaxis. *International Endodontic Journal* **43**, 902–8.

Don-Salu-Hewage AS, Chan SY, McAndrews KM *et al.* (2013) Cysteine (C)-X-C receptor 4 undergoes transportin 1-dependent nuclear localization and remains functional at the nucleus of metastatic prostate cancer cells. *Plos One* **8**, e57194.

El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (2017) *WHO classification of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press.

Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ (2009) Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 25–31.

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.

Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Mroczko B (2020) The role of selected chemokines and their receptors in the development of gliomas. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 3704.

Janssens R, Mortier A, Boff D *et al.* (2016) Natural nitration of CXCL12 reduces its signaling capacity and chemotactic activity in vitro and abrogates intra-articular lymphocyte recruitment in vivo. *Oncotarget* **7**, 62439–59.

Janssens R, Struyf S, Proost P (2018) Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **44**, 51–68.

Jiang L, Peng WW, Li LF, Yang Y, Zhu YQ (2012) Proliferation and multilineage potential of CXCR4-positive human dental pulp cells in vitro. *Journal of Endodontics* **38**, 642–7.

Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Bastone MD (2014) Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* **5**, 9–14.

Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K *et al.* (2007) CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *The American Journal of Pathology* **171**, 1249–57.

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.

Kim DS, Kim YS, Bae WJ *et al.* (2014) The role of SDF-1 and CXCR4 on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *International Endodontic Journal* **47**, 534–41.

Kircher M, Herhaus P, Schottelium M *et al.* (2018) CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. *Annals of Nuclear Medicine* **32**, 503–11.

Kolokythas A, Karas M, Sarna T, Flick W, Miloro M (2012) Does cytokine profiling of aspirate from jaw cysts and tumors have a role in diagnosis? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **70**, 1070–80.

Lin CH, Shih CH, Tseng CC *et al.* (2014) CXCL12 Induces connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts through the Rac1/ ERK, JNK, and AP-1 pathways. *Plos One* **9**, e104746.

Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D *et al.* (2010) T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *Journal of Endodontics* **36**, 995–9.

Miller MC, Mayo KH (2017) Chemokines from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, e2088.

Moreira PR, Santos DF, Martins RD, Gomez RS (2000) CD57+ cells in radicular cyst. *International Endodontic Journal* **33**, 99–102.

Myoung H, Hong SP, Hong SD *et al.* (2001) Odontogenic keratocyst: review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **91**, 328–33.

Muglali M, Komerik N, Bulut E *et al.* (2008) Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **37**, 185–9.

Murphy PM, Heusinkveld L (2018) Multisystem multitasking by CXCL12 and its receptors CXCR4 and ACKR3. *Cytokine* **109**, 2–10.

Peixoto RF, Pereira JS, Nonaka CF, Silveira EJ, Miguel MC (2012) Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Archives of Oral Biology* **57**, 1159–64.

Santos LC, Ramos EA, Gurgel CA, de Santana EJ, Dos Santos JN (2007) Immunohistochemical detection of Langerhans cells in dental granulomas and radicular cysts. *Journal of Molecular Histology* **38**, 201–5.

Scala S (2015) Molecular pathways: targeting the CXCR4–CXCL12 axis – untapped potential in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research* **21**, 4278–85.

Siegfried G, Descarpentrie J, Evrard S, Khatib AM (2020) Proprotein convertases: key players in inflammation-related malignancies and metastasis. *Cancer Letters*, **473**, 50–61.

Silva TA, Garlet GP, Lara VS *et al.* (2005) Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiology and Immunology* **20**, 310–6.

Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S *et al.* (2013) Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor* **24**, 41–49.

Smith JM, Johanesen PA, Wendt MK, Binion DG, Dwinell MB. CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **288**, G316–26.

Takabatake Y, Sugiyama T, Kohara H *et al.* (2009) The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature. *Journal of the American Society of Nephrology* **20**, 1714–23.

Takata N, Yokoo S, Komori T (2011) The cytobiological differences between two odontogenic cyst-lining keratinocytes. *Kobe Journal of Medical Sciences* **57**, e75–86.

Yu L, Yu L, Pham Q, Wang TTY (2018) Transcriptional and translational-uncoupling in regulation of the CXCL12 and its receptors CXCR4, 7 in THP-1 monocytes and macrophages. *Immunity, Inflammation and Disease* **6**, 106–16.

Zhu YT, Li F, Zhang Y *et al.* (2020) HC-HA/PTX3 purified from human amniotic membrane reverts human corneal fibroblasts and myofibroblasts to keratocytes by activating BMP signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **61**, 62.

Ziarek J, Kleist AB, London N *et al.* (2017) Structural basis for chemokine recognition by a G protein-coupled receptor and implications for receptor activation. *Science Signaling* **10**, e5756.

Zilkha-Falb R, Kaushansky N, Kawakami N, Ben-Nun A (2016) Post-CNS-inflammation expression of CXCL12 promotes the endogenous myelin/ neuronal repair capacity following spontaneous recovery from multiple sclerosis-like disease. *Journal of Neuroinflammation* **13**, 7.

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

Dados clínicos	CR	CD	CO
<i>Idade (em anos)</i>			
Variação	6 – 67	13 – 59	8 – 69
Média ± desvio padrão	32,5 ± 14,7	30,2 ± 16,1	37,3 ± 17,8
<i>Sexo</i>			
Feminino	15 (75,0%)	13 (65,0%)	15 (75,0%)
Masculino	5 (25,0%)	7 (35,0%)	5 (25,0%)
<i>Localização anatômica</i>			
Maxila	15 (75,0%)	9 (45,0%)	5 (25,0%)
Mandíbula	5 (25,0%)	11 (55,0%)	15 (75,0%)

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

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
CXCL12	P-159X	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	1:50	Citrato, pH 6.0 Steamer, 90°C, 30min	<i>Overnight</i>
CXCR4	12G5	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	1:750	Citrato, pH 6.0 Steamer, 90°C, 30min	60 minutos

Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 e significância estatística (*P*) para as imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa dos CRs de acordo com o padrão do epitélio e a intensidade do infiltrado inflamatório.

Localização/ Variáveis	n	CXCL12		CXCR4			
		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	<i>P</i>	Citoplasma		Núcleo	
				Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	<i>P</i>	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	<i>P</i>
<i>Revestimento epitelial</i>							
Padrão do epitélio							
Atrófico	9	36,4 (10,7 – 72,9)	0,518	100,0 (39,7 – 100,0)	0,871	53,4 (10,6 – 66,1)	0,305
Hiperplásico	11	41,1 (19,9 – 81,6)		97,9 (39,9 – 100,0)		36,1 (8,1 – 52,9)	
Infiltrado inflamatório							
Grau I/ II	7	81,4 (12,4 – 82,9)	0,552	42,9 (38,5 – 100,0)	0,162	36,1 (14,8 – 57,3)	0,782
Grau III	13	28,2 (18,3 – 61,5)		100,0 (65,9 – 100,0)		40,8 (7,6 – 58,9)	
<i>Cápsula fibrosa</i>							
Padrão do epitélio							
Atrófico	9	6,6 (1,9 – 13,0)	0,732	22,1 (2,9 – 52,7)	0,909	10,4 (0,9 – 32,6)	0,970
Hiperplásico	11	9,2 (1,1 – 40,8)		8,3 (1,4 – 64,9)		5,1 (1,5 – 27,3)	
Infiltrado inflamatório							
Grau I/ II	7	8,4 (1,7 – 27,2)	0,405	22,1 (0,5 – 40,6)	0,452	27,3 (0,9 – 36,6)	0,322
Grau III	13	6,0 (0,9 – 11,9)		8,4 (1,8 – 67,2)		4,9 (1,2 – 20,9)	

Tabela 4. Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (P) para as imunorexpressões de CXCL12 e CXCR4 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa dos CRs, CDs e COs.

Localização/ Correlações	CR (n = 20)		CD (n = 20)		CO (n = 20)	
	R	P	r	P	r	P
<i>Revestimento epitelial</i>						
CXCL12 x CXCR4 (citoplasma)	0,213	0,367	0,242	0,303	- 0,344	0,138
CXCL12 x CXCR4 (núcleo)	0,168	0,478	0,426	0,061	0,005	0,982
CXCR4 (citoplasma) x CXCR4 (núcleo)	0,597	0,005	0,678	0,001	0,243	0,302
<i>Cápsula fibrosa</i>						
CXCL12 x CXCR4 (citoplasma)	0,299	0,200	0,350	0,130	- 0,193	0,414
CXCL12 x CXCR4 (núcleo)	0,523	0,018	0,256	0,277	- 0,047	0,845
CXCR4 (citoplasma) x CXCR4 (núcleo)	0,555	0,011	0,937	< 0,001	0,796	< 0,001

Figura 1. Expressão citoplasmática de CXCL12 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa de CR (A), CD (B) e CO (C) (*Immunohistoprobe PlusTM*, 200×).

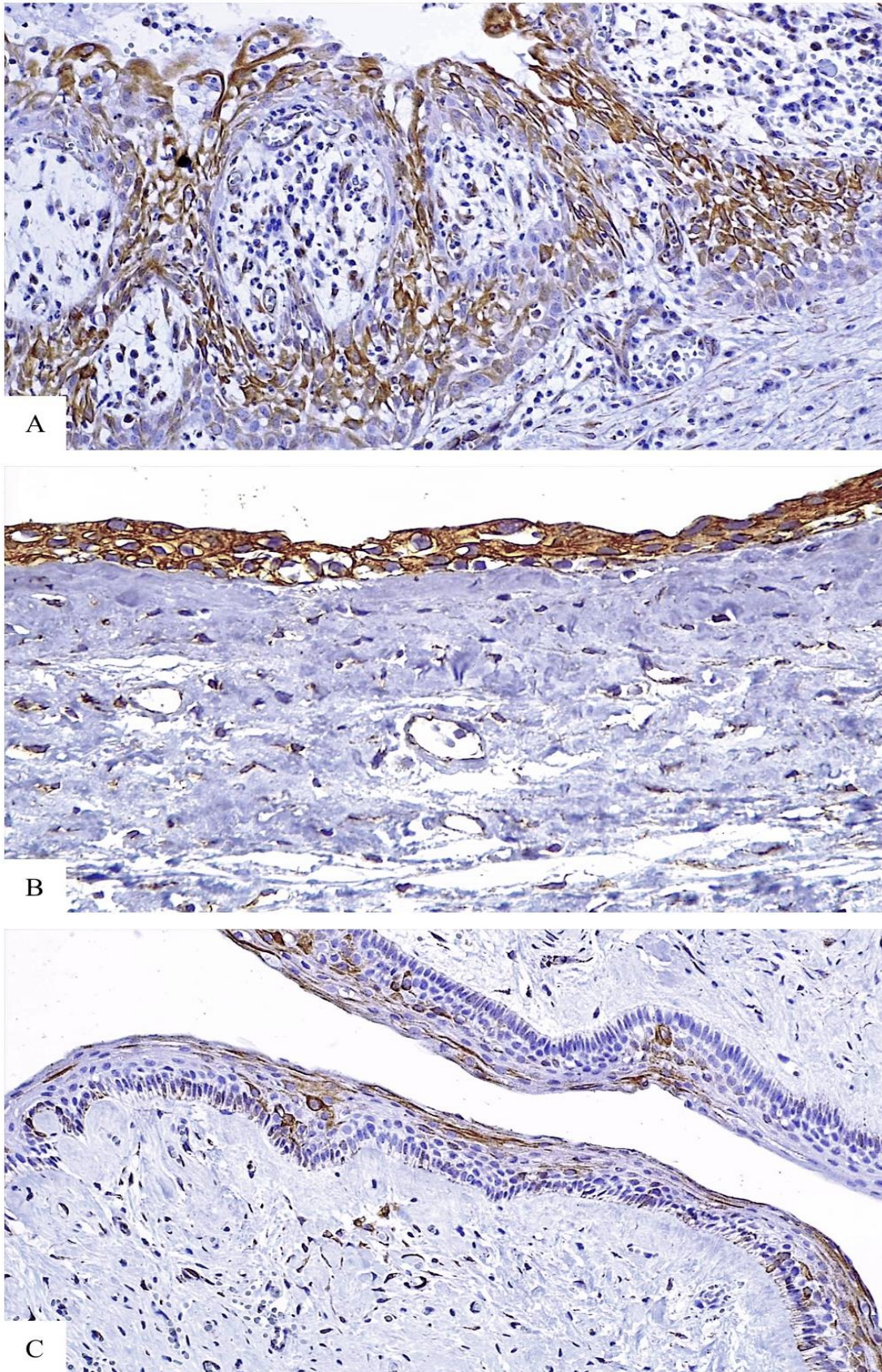


Figura 2. BloxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti-CXCL12 (A) e anti-CXCR4 (citoplasma [B] e núcleo [C]) em epitélio e cápsula fibrosa de COs, CRs e CDs.

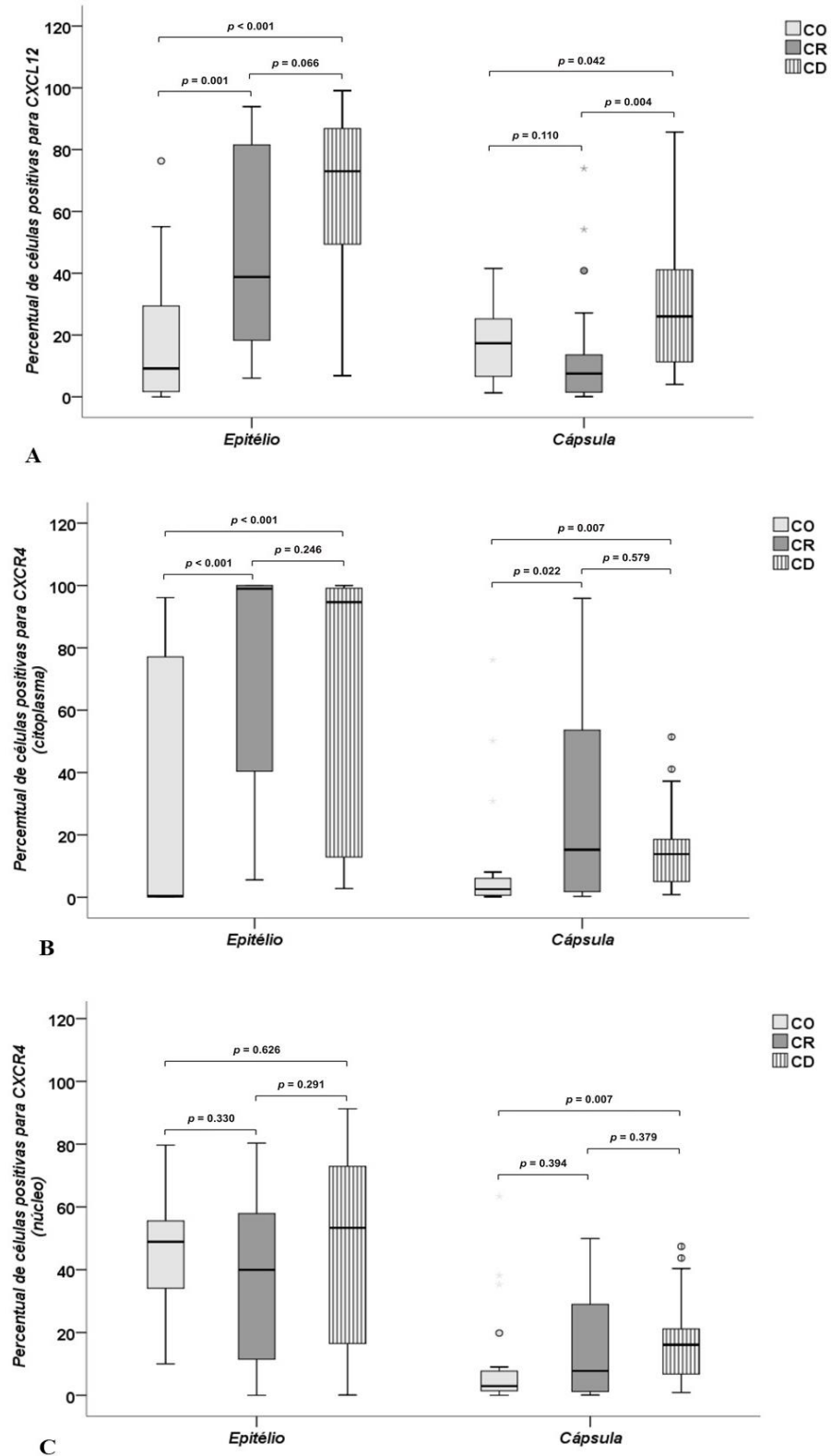
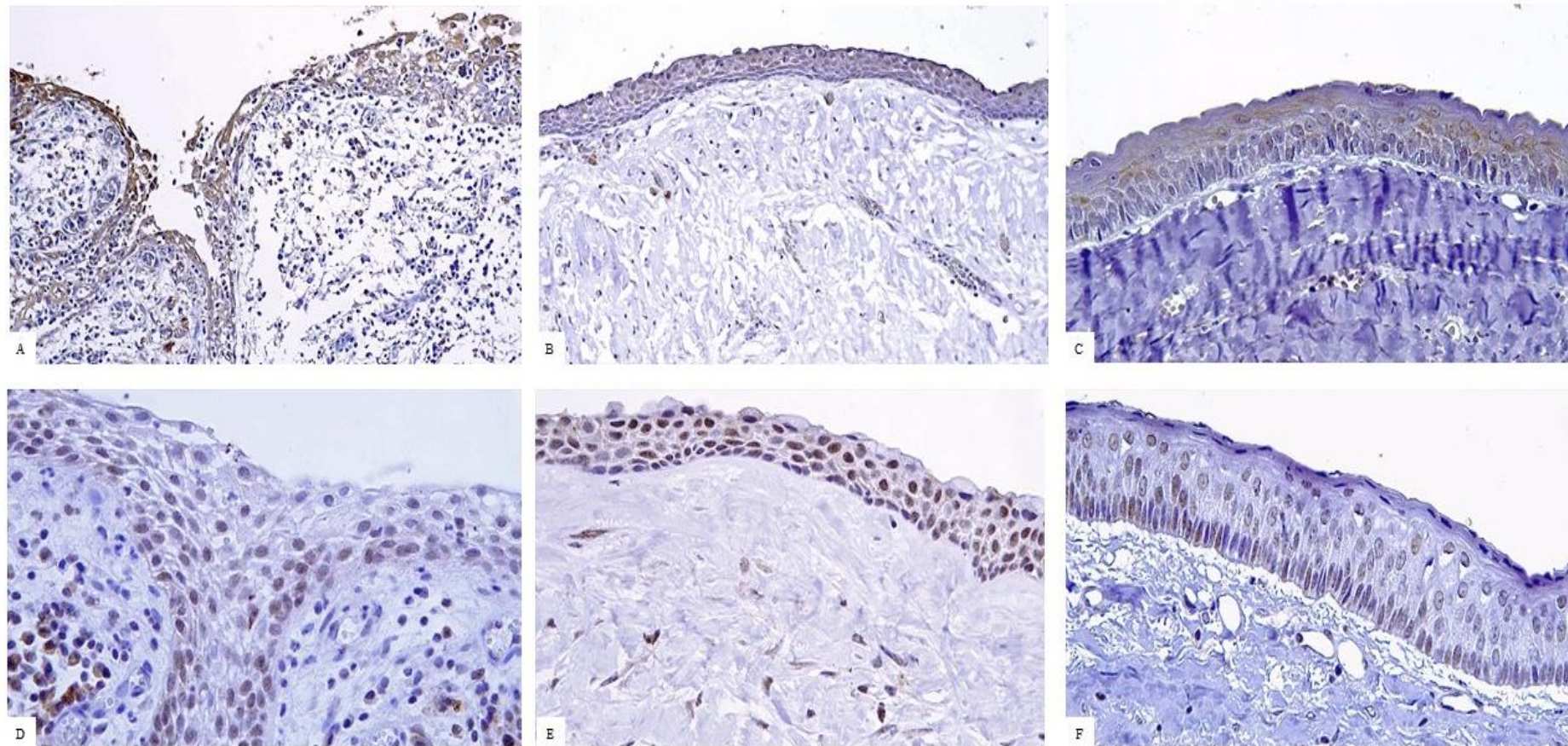


Figura 3. Expressão citoplasmática de CXCR4 no revestimento epitelial de CR (A), CD (B) e CO (C). Detalhe da expressão de CXCR4 no núcleo de células do componente epitelial e no citoplasma de células da cápsula fibrosa de CR (D), CD (E) e CO (F) (*Immunohistoprobe PlusTM*, 200×).



Considerações finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os CRs, CDs e COs são os cistos odontogênicos mais prevalentes dos ossos gnáticos, mas diversos aspectos relacionados à patogênese e ao comportamento biológico dessas lesões permanecem incompletamente compreendidos.

Estudos relacionam a participação da via de sinalização CXCL12-CXCR4 em processos patológicos, com destaque para doenças imunoinflamatórias. Nesse contexto, os resultados do presente estudo sugerem uma importante participação da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 na patogênese de CRs, CDs e COs. Essas proteínas podem ser particularmente relevantes no desenvolvimento de cistos odontogênicos com comportamento biológico menos agressivo.

Os achados desta pesquisa também ressaltam a importância de futuras investigações a respeito das formas (monomérica/ dimérica) da quimiocina CXCL12 em CRs, CDs e COs, bem como da eventual associação de CXCR4 com outros receptores de quimiocinas, como CXCR7, nestas lesões. Destaca-se, ainda, a necessidade de novos estudos direcionados ao entendimento do processo de translocação e das funções nucleares de CXCR4 em lesões odontogênicas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALLISON, J. R.; GARLINGTON, G. The value of cone beam computed tomography in the management of dentigerous cysts – a review and case report. **Dental Update**, v. 44, n.3, p. 182-188, 2017.
- 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. 249-253, 2019.
- ANDRADE, A. L. *et al.* Analysis of tryptase-positive mast cells and immunoexpression of MMP-9 and MMP-13 in periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 5, p. 446-454, 2017.
- ANTHONAPPA, R. P. *et al.* Genetic basis of dentigerous cysts associated with supernumerary teeth: A narrative review. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2018.
- BALKWILL, F. A. The chemokine system and cancer. **Journal of Pathology**, v. 2, n. 226, p. 148-157, 2012.
- BANDO, Y.; HENDERSON, B.; MEGHIL, S.; POOLE, S.; HARRIS, M. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 221-227, 1993.
- BAVA, F. A.; UMAR, D.; BAHSEER, B.; BAROUDI, K. Bilateral radicular cyst in mandible: an unusual case report. **Journal of International Oral Health**, v. 7, n. 2, p. 61-63, 2015.
- BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. 3 ed, WHO Classification of Tumours, 343p., 2005.
- BARRETO, D. C.; GOMEZ, R. S.; BALE, A. E.; BASON, W. L.; DE MARCO, L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1418-1422, 2000.
- BHAKHAR, V. P. *et al.* A comparative analysis of cytokeratin 18 and 19 expressions in odontogenic keratocyst, dentigerous cyst and radicular cyst with a review of literature. **Journal of Clinical and Diagnostic Research for Doctors**, v. 10, n. 7, p. 85-89, 2016.
- BERNARDI, L.; VISIOLI, F.; NÖR, C.; RADOS, P. V. Radicular cyst: an update of the biological factors related to lining epithelium. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 12, p. 1951-1961, 2015.
- BORGHESI, A. *et al.* Odontogenic keratocyst: imaging features of a benign lesion with an aggressive behavior. **Insights into Imaging**, v. 9, n. 5, p. 883-897, 2018.

BORRÁS-FERRERE, J. *et al.* Dentigerous cyst with parietal and intracystic calcifications: A case report and literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 10, n. 3, p. 296-299, 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. 728-733, 2018.

BRUNN, A. *et al.* Differential effects of CXCR4-CXCL12- and CXCR7-CXCL12-mediated immune reactions on murine P0106–125-induced experimental autoimmune neuritis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 39, n. 7, p. 772-782, 2013.

CAVALLA, F. *et al.* High levels of CXC ligand 12/stromal cell-derived factor 1 in apical lesions of endodontic origin associated with mast cell infiltration. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 10, p. 1234-1239, 2013.

CHANG, C. H. *et al.* Significant association of inflammation grade with the number of Langerhans cells in odontogenic keratocysts. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 116, n. 10, p. 798-805, 2017.

CHEN, J. H. *et al.* Clinicopathological analysis of 232 radicular cysts of the jawbone in a population of southern Taiwanese patients. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 249-254, 2018.

COȘARCĂ, A. S. *et al.* The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 57, n. 2, p. 407-412, 2016.

CUNHA, J. F. *et al.* Clinicopathologic features associated with recurrence of the odontogenic keratocyst: a cohort retrospective analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v. 121, n. 6, p. 629-635, 2016.

DE ANDRADE, A. L. D. L. *et al.* Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box P3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 8, p. 990-994, 2013.

DE ANDRADE SANTOS, P. P. *et al.* Immunohistochemical expression of nuclear factor κ 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. 476-483, 2011.

DE CARVALHO, I. K. F.; LUNA, A. H. B. Spontaneous eruption of premolar associated with a dentigerous cyst. **Case Reports in Dentistry**, v. 2016, p. 5323978, 2016.

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. 2089-2101, 2018.

- DE OLIVEIRA, R. C. *et al.* Higher expression of galectin-3 and galectin-9 in periapical granulomas than in radicular cysts and an increased toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression are associated with reactivation of periapical inflammation. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 199-203, 2014.
- DE SOUZA, L. B. *et al.* Odontogenic cysts: demographic profile in a Brazilian population over a 38-year period. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 15, n. 4, p. 583-590, 2010.
- DEZEREGA, U. *et al.* Monocyte chemotactic protein-3: possible involvement in apical periodontitis chemotaxis. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 10, p. 902-908, 2010.
- EL-NAGGAR, A. K. *et al.* **WHO classification of and neck tumours**. International Agency for Research on Cancer, 4 ed, 2017, p. 343.
- EPSTEIN, E. H. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 1, p. 743-754, 2008.
- GOMES, B. P. F. A.; HERRERA, D. R. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. **Brazilian Oral Research**, v. 32, n. 1, p. e69, 2018.
- GUO, Y. Y. *et al.* *PTCH1* gene mutations in keratocystic odontogenic tumors: a study of 43 Chinese patients and a systematic review. **PLoS One**, v.8, n. 10, p. e77305, 2013.
- FLORINDO, J. B.; BRUNO, O. M.; LANDINI, G. Morphological classification of odontogenic keratocysts using Bouligand– Minkowski fractal descriptors. **Computers in Biology and Medicine**, v. 81, p. 1-10, 2017.
- FUKADA, S. Y. *et al.* Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 1, p. 25-31, 2009.
- FRIEDLANDER, L. T. *et al.* VEGF and VEGFR2 in dentigerous cysts associated with impacted third molars. **Pathology**, v. 47, n. 5, p. 446-451, 2015.
- GADBAIL, A. R.; CHAUDHARY, M.; PATIL, S.; GAWANDE, M. Actual proliferating index and p53 protein expression as prognostic marker in odontogenic cysts. **Oral Diseases**, v. 15, n. 7, p. 490–8, 2009.
- GENDVILIENE, I. *et al.* Conservative management of large mandibular dentigerous cysts with a novel approach for follow up: Two case reports. **Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal**, v. 19, n. 1, p. 24-32, 2017.
- GHANDOUR, L.; BAHMAD, H. F.; BOU-ASSI, S. Conservative treatment of dentigerous cyst by marsupialization in a young female patient: a case report and review of the literature. **Case Reports in Dentistry**, v. 2018, p. 7621363, 2018.

- CABRERO-DE LAS HERAS, S.; MARTÍNEZ-BALIBREA, E. CXC family of chemokines as prognostic or predictive biomarkers and possible drug targets in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 42, p. 4738-4749, 2018.
- HUANG, G.; MOORE, L.; LOGAN, R. M.; GUE, S. Histological analysis of 41 dentigerous cysts in a paediatric population. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 48, n. 1, p. 74-78, 2019.
- HWANG, D. S. *et al.* Retrospective clinical study of multiple keratocystic odontogenic tumors in non-syndromic patients. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 44, n. 3, p. 107-111, 2018.
- JAAFARI-ASHKAVAND, Z.; GERAMIZADEH, B.; RANJBAR, M. A. P63 and Ki-67 expression in dentigerous cyst and ameloblastomas. **Journal of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences**, v. 16, n. 4, p. 323-328, 2015.
- JAEGER, F. *et al.* Prevalence profile of odontogenic cysts and tumors on Brazilian sample after the reclassification of odontogenic keratocyst. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 2, p. 267-270, 2017.
- JANSSENS, R.; STRUYF, S.; PROOST, P. Pathological role of the homeostatic chemokine CXCL12. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 44, p. 51-68, 2018.
- Jl, H. J. *et al.* Differential diagnosis of periapical cyst using collagen birefringence pattern of the cyst wall. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 42, n. 2, p. 11-117, 2017.
- JIANG, L.; PENG, W. W.; LI, L. F.; YANG, Y.; ZHU, Y. Q. Proliferation and multilineage potential of CXCR4-positive human dental pulp cells in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 5, p. 642-647, 2012.
- JOHNSON, N. R.; GANNON, O. M.; SAVAGE, N. W.; BASTONE, M. D. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 9-14, 2014.
- KAWAGISHI, H. *et al.* Sonic hedgehog signaling regulates the mammalian cardiac regenerative response. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 123, p. 180-184, 2018.
- 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, n. p. 17-22, 2018.
- KEINAN, D.; COHEN, R. E. The significance of epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 5, p. 582-587, 2013.
- KIM, D. S. *et al.* The role of SDF-1 and CXCR4 on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 6, p. 534-541, 2014.

- KIM, K. H. *et al.* Expression of sonic hedgehog signaling molecules in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium. **Pathology International**, v. 59, n. 2, p. 279-287, 2009.
- KIRCHER, M. *et al.* CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 32, n. 8, p. 503-11, 2018.
- KONTOGIANNIS, T. G. *et al.* Periapical lesions are not always a sequelae of pulpal necrosis: a retrospective study of 1521 biopsies. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 1, p. 68-73, 2015.
- KOLOKYTHAS, A.; KARAS, M.; SARNA, T.; FLICK, W.; MILORO, M. Does cytokine profiling of aspirate from jaw cysts and tumors have a role in diagnosis? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 5, p. 1070-1080, 2012.
- LEVANAT, S.; PAVELIÉ, B.; CRNIÉ, I.; ORESKOVIÉ, S.; MANOJLOVIÉ, S. Involvement of *PTCH* gene in various noninflammatory cysts. **Journal of Molecular Medicine**, v. 78, p. 140-146, 2000.
- LIN, L. M.; HUANG, G. T. J.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 908-916, 2007.
- LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 7, p. 464-471, 2003.
- MARÇAL, J. R. *et al.* T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 6, p. 995-999, 2010.
- MYOUNG, H. *et al.* Odontogenic keratocyst: review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v. 91, n. 3, p. 328-333, 2001.
- MILLER, M. C.; MAYO, K. H. Chemokines from a structural perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. e2088, 2017.
- 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.
- MUGLALI, M. *et al.* Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 3, p. 185-189, 2008.
- NAIR, P. N. R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 15, n. 6, p. 348-381, 2004.
- NAIR, P. N. R. New perspectives on radicular cysts: do they heal? **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 3, p. 155-160, 1998.

- NAGASAWA, T. *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature**, v. 15, n. 382, p. 635-638, 1996.
- NONAKA, C. F. *et al.* Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 106, n. 6, p. 896-902, 2008.
- NAUFEL, A. O.; AGUIAR, M. C. F.; MADEIRA, F. M.; ABREU, L. G. Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n. 31, e103, 2017.
- 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. 1159–1164, 2012.
- PHILIPSEN, H. P. On keratocysts in the jaws. **Tandleageblad**, v. 60, n. 1, p. 963–980, 1956.
- 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. 269-273, 2011.
- RICHTER, R. *et al.* Identification and characterization of circulating variants of CXCL12 from human plasma: Effects on chemotaxis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 16, p. 1959-1974, 2014.
- RUIZ, P. A. *et al.* Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in radicular and residual radicular cysts. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 6, p. 613-620, 2010.
- SCALA, S. Molecular pathways: targeting the CXCR4–CXCL12 axis – untapped potential in the tumor microenvironment. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 19, p. 4278-4285, 2015.
- SEVEKAR, S.; SUBHADRA, H. N.; VAISSHALI, D. Radicular cyst associated with primary molar: Surgical intervention and space management. **Indian Journal of Dental Research**, v. 29, n. 6, p. 836-839, 2018.
- SILVA, T. A. *et al.* Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 5, p. 310-316, 2005
- SPEIGHT, P. *et al.* **Odontogenic keratocyst**. In: EL-NAGGAR, A. K. *et al.* **WHO classification of head and neck tumours**. 4 ed, Lyon: IARC Press, p. 235-236, 2017.
- STROJNY, C. *et al.* Interferon gamma – treated dental pulp stem cells promote human mesenchymal stem cell migration *in vitro*. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1259-1264, 2015.
- TAKATA, N.; YOKOO, S.; KOMORI, T. The cytobiological differences between two odontogenic cyst-lining keratinocytes. **Kobe Journal of Medical Sciences**, v. 57, n. 2, p. 75-86, 2011.

TEIXIDÓ, J.; MARTÍNEZ-MORENO, M.; DÍAS-MARTÍNEZ, M.; SEVILLA-MOVILLA, S. The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 95, p. 121-131, 2018.

VERED, M.; PELEG, Ó.; TAICHER, S.; DE BUCHNER, U. 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.

ZIAREK, J. J. *et al.* Structural basis for chemokine recognition by a G protein-coupled receptor and implications for receptor activation. **Science Signaling**, v. 10, n. 471, p. e 5756, 2017.

ZILKHA-FALB, R.; KAUSHANSKY, N.; KAWAKAMI, N.; BEN-NUN A. Post-CNS-inflammation expression of CXCL12 promotes the endogenous myelin/ neuronal repair capacity following spontaneous recovery from multiple sclerosis-like disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, p. 7, 2016.

WOO, S. B. **Oral Pathology: A comprehensive atlas and text**. 1 ed, Philadelphia: Elsevier, 442p., 2012.

Anexos

ANEXO A. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CISTOS RADICULARES, CISTOS DENTÍGEROS E CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS

Pesquisador: Cassiano Francisco Weege Nonaka

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13246919.1.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.339.761

Apresentação do Projeto:

Cisto pode ser definido como uma cavidade patológica revestida por epitélio, que apresenta um material líquido ou semissólido em seu interior. Os cistos radiculares (CRs), cistos dentígeros (CDs) e ceratocistos odontogênicos (COs) são os cistos odontogênicos que ocorrem com maior frequência na região oral maxilofacial. Apesar dos avanços no conhecimento da patogênese dessas lesões, os mecanismos responsáveis pelas diferenças nos seus comportamentos biológicos ainda estão em discussão. As quimiocinas podem ser definidas como pequenas citocinas quimioatrativas que se ligam a receptores heterotriméricos de superfície celular acoplados à proteína G. A quimiocina CXCL12, também denominada fator 1 derivado de células estromais (SDF-1), exerce suas funções interagindo com o seu principal receptor de quimiocina CXCR4. Embora as pesquisas sobre a participação da proteína CXCL12 e do seu receptor CXCR4 em lesões odontogênicas sejam escassas, as evidências obtidas revelam uma atuação significativa de quimiocinas em processos relacionados ao desenvolvimento de lesões periapicais inflamatórias. Dessa forma, o presente estudo se propõe a avaliar a imunexpressão de CXCL12 e CXCR4 em CRs, CDs e COs. Espera-se, com esta pesquisa, contribuir para uma melhor compreensão das diferenças relacionadas ao comportamento biológico e patogênese dessas lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Avaliar as imunexpressões das proteínas CXCL12 e CXCR4 em CRs, CDs e COs.

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 3.339.761

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1275545.pdf	07/05/2019 12:55:06		Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	07/05/2019 12:48:48	ALLANY DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	07/05/2019 09:48:33	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoInstitucional.pdf	07/05/2019 09:33:04	ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	07/05/2019 09:27:57	ALLANY DE OLIVEIRA ANDRADE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 22 de Maio de 2019

Assinado por:

Dóris Nóbrega de Andrade Laurentino
(Coordenador(a))

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

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, 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, <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 RAnomized 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://pride-endodonticguidelines.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)

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. 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 non-subscribers 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

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

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.

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. 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). Reference Manager reference styles can be searched for here: 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 pixel-oriented 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. 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

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. 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), 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.

Apêndices
