



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA**

ROBECI ALVES MACÊDO FILHO

IMUNOEXPRESSÃO LINFÓCITOS (T CD4+ / T CD8+) E PROTÉINAS DO *CHECK POINT* IMUNE (PD-1 E PD-L1) EM LESÕES PERIAPICAIS PRIMÁRIAS E PERSISTENTES

CAMPINA GRANDE – PB

2023

ROBECI ALVES MACÊDO FILHO

IMUNOEXPRESSÃO LINFÓCITOS (T CD4+ / T CD8+) E PROTÉINAS DO *CHECK POINT* IMUNE (PD-1 E PD-L1) EM LESÕES PERIAPICAIS PRIMÁRIAS E PERSISTENTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Diagnóstico e distribuição e fatores associados aos agravos à saúde bucal

Orientador: Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez

CAMPINA GRANDE – PB

2023

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.

M141i Macêdo Filho, Robeci Alves.
Imunoexpressão linfócitos (T CD4+/T CD8+) e proteínas do *check point imune* (PD-1 e PD-L1) em lesões periapicais primárias e persistentes [manuscrito] / Robeci Alves Macêdo Filho. - 2023.
90 p. : il. colorido.

Digitado.
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.
"Orientação : Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS. "
1. Endodontia. 2. Lesões periapicais persistentes. 3. Lesões periapicais primárias. I. Título

21. ed. CDD 617.634 2

ROBECI ALVES MACÊDO FILHO

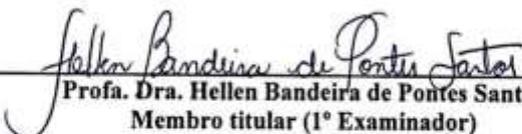
IMUNOEXPRESSÃO LINFÓCITOS (T CD4+ / T CD8+) E PROTÉINAS DO CHECK POINT IMUNE (PD-1 E PD-L1) EM LESÕES PERIAPICAIS PRIMÁRIAS E PERSISTENTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia

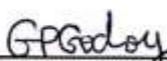
Área de concentração: Diagnóstico e distribuição e fatores associados aos agravos à saúde bucal

Aprovada em 23 / 03 / 2023

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos
Membro titular (1º Examinador)



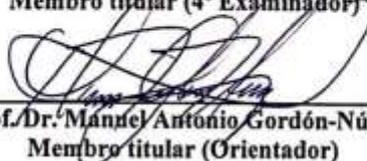
Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy/UFPE
Membro titular (2º Examinador)



Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves
Membro titular (3º Examinador)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/UEPB
Membro titular (4º Examinador)



Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez
Membro titular (Orientador)

A **Deus**, o centro e sentido de todas as coisas;
A **Maria Santíssima**, aquela que acolheu minhas dores e me
amparou como mãe;

Aos meus pais **Robeci** (*in memoriam*) e **Sales**, pelo amor e cuidado
incondicional e por todos os esforços para a concretização dos meus sonhos;

“Você não sabe o quanto eu caminhei pra chegar até aqui”
(*Bino Farias*)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof.º Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez, por ter sido um dos primeiros professores a me incentivar na jornada do mundo acadêmico. Quando todos diziam que tentar a seleção do mestrado durante a graduação era loucura, o senhor me apoiou e incentivou. Hoje sou a prova que sonhos podem se tornar realidade, basta ir atrás deles. Nossos diálogos sempre são cativantes. Escutar suas histórias de vida é uma fonte de motivação e inspiração.

Ao Prof.º Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, por todas as horas que pacientemente se dedicou ao meu aprendizado e à concretização desta pesquisa. Acredito que por muito tempo fui quase um caso perdido para o senhor, contudo, durante todo esse tempo o tive como referência do que é ser um profissional de excelência e inspiração para trilhar o meu caminho na docência e clínica. Saiba que cada minuto dedicado a colocar discernimento no meu processo foi fundamental para que hoje eu pudesse concluir essa jornada. O seu incentivo e apoio durante todo esse processo foram, sem dúvidas, o que moveram este trabalho desde sua elaboração até este momento. Ao final dessa caminhada, percebo o quanto poderia ter aproveitado mais a vivência na pesquisa, entretanto, a vida não é a mesma para todos e, em alguns momentos, precisamos trilhar caminhos que nos afastam de algumas experiências e pessoas, mas que são importantes para a nossa construção pessoal e profissional. Todavia, faço disso uma motivação e desafio para quem sabe continuarmos em busca da amostra perfeita. Estarei sempre a lhe procurar.

À Prof.ª Dra. Pollianna Muniz Alves, que me acolheu como orientando assim que ingressei no mestrado aqui na UEPB, sei que por um tempo me comportei como filho rebelde e ingrato, contudo, com o processo de amadurecimento, percebi o quanto fui imaturo, acredito que não estava totalmente pronto para adentrar na academia, mas me questiono até hoje se existe momento certo para ir em busca de sonhos. Apesar disso, saiba que a senhora foi fundamental para me preparar para a docência, me ensinou e preparou para ministrar aulas. Ainda me lembro da primeira aula que ministrei, tive que passar quatro vezes antes para senhora, parecia uma metralhadora humana, falando descontroladamente e tomando dois litros de água (hehehehe). Com o tempo, amadureci e levo todos os seus ensinamentos. Por onde ministro aula e quando recebo um elogio, saiba que lhe referencio como inspiração e como responsável por minha formação de ser professor.

A vocês três só tenho a agradecer e me colocar sempre à disposição. Saibam que levarei cada um de vocês por toda esta vida.

AGRADECIMENTOS

A Nossa Senhora, só quem é órfão sabe o valor do amor de uma mãe.

*Aos meus pais, **Robeci (in memoriam)** e **Sales**, por todos os ensinamentos, empenho e amor em me proporcionar todo o suporte necessário para a realização dos meus sonhos. Em especial, a minha mãe, agradeço por todas as renúncias, pois devido à partida de pai, assumiu toda responsabilidade de criar três filhos. Hoje estamos aqui comemorando essa vitória que dedico à senhora.*

*À minha avó **Chiquinha (in memoriam)**, por me ensinar sobre o cuidado e amor. Agradeço por cada incansável oração elevada a Deus em prol da minha felicidade. No começo da minha jornada acadêmica, Deus a chamou, e lá no céu sei que olha para mim e me abençoa diariamente.*

*Ao meu companheiro, **Tiago Leal**, por todo amor e paciência que demonstrou durante todo este tempo. Agradeço por acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditei. Você me transmitiu paz em todos os momentos de ansiedade e alvoroço, e me consolou nos de tristeza. Suportou minhas ausências sem reclamar, sabendo que eu estava lutando por um sonho, que o caminho era longo e que eu precisava de todo o suporte possível. Esta vitória é metade minha e metade sua. Obrigada por tudo!*

*Aos meus irmãos, **Nygue, Nydja, Aninha, Vania, Ruth e Rubenia**, pelo amor, companheirismo e parceria de uma vida inteira.*

*A minha sobrinha e afilhada, **Helena**, que desde o seu nascimento encanta os meus dias mesmo morando distante. Nossa relação é de outras vidas e nesta eu serei um dos responsáveis por cuidar, proteger e amar você.*

*À toda a família, por todo o carinho e palavras de incentivo. Em especial, à tia **Suely**, pela solicitude e generosidade constantes.*

*Aos amigos dos Laboratórios de Imunoistoquímica e Histopatologia Oral da UEPB: **Luan, Luana, Wliana, Allany, Amanda, Daniella, Fabiana, Ingrid, Emanuene, Marayza, Thamyres, Elton, Vanessa, Lais, Pamela e Raelly**. Compartilhamos momentos e experiências que contribuíram para amenizar e superar cada obstáculo que se apresentou durante este percurso. Vocês tornaram esta caminhada mais leve!*

*À **Wliana, Allany e Elton**, por todo o auxílio nas etapas finais da execução desta pesquisa. Tenho certeza de que não foi fácil assumir tanto trabalho, tirando as próprias férias, mas saibam que minha gratidão será eterna e sempre poderão contar comigo.*

A **Luan Barnabé**, por sua parceria em tantos momentos. Inteligente, divertido e generoso. Sempre ofereceu seu ombro amigo e palavras de motivação em inúmeras ocasiões.

À **Tiago Rodrigues**, por ser mais que um amigo, um irmão que a vida me deu. Desde a graduação me acompanha, nos momentos difíceis e alegres me valia da sua conversa e ajuda. Falei tanto de odontologia, que resolveu correr atrás de seu sonho também e hoje também faz o curso, e tão logo seremos colegas de profissão. Você é a minha pessoa na terra, sabe mais de mim que qualquer outra pessoa. Obrigado por tudo.

Aos eternos amigos: **Alana, Juliana, Keka, Cibely, Maryza, Vera, Rose, Wagner, Erika, Polliana, Erick e Tamara**. Mesmo com minhas ausências, sempre tentaram se fazer presentes. Ouviram, confortaram e alegraram meus dias. Sempre serei grato por estes mais de 10 anos de amizade, embasados na confiança e carinho.

À equipe SolRiso: **Tiago Ribeiro, Tiago Rodrigues, Rose, Maryza, Rayane, Aninha e Sales**, por abraçarem meu sonho de proporcionar uma odontologia de excelência na minha amada Solanea-PB. Sei que por esse tempo fui ausente e, em alguns momentos, só chegava para cobrar, porém de olhos fechados confiei a empresa nas mãos de vocês. A SolRiso é movida pelo empenho e dedicação de cada um de vocês.

À técnica, **Denize Souza**, não tenho palavras para agradecer toda a cooperação para a concretização desta pesquisa. Sempre com um sorriso no rosto, estava pronta a ajudar, ouvir e aconselhar.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta tese: **Prof.º Dr. Gustavo Pina Godoy, Prof.ª Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos, Prof.º Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez, Prof.ª Dra. Pollianna Muniz Alves e Prof.º Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, que gentilmente aceitaram o convite, pela dedicação na leitura e pelas contribuições que serão apresentadas.

À **Prof.ª Dra. Sandra Aparecida Marinho**, exemplo de mulher, docente e pesquisadora. Agradeço pelos preciosos ensinamentos e conselhos que me deu, sobre a pesquisa, a docência e a vida. Relação de orientação que foi além da graduação, e vez por outra ainda puxa minha orelha.

Às **Prof.ª Ma. Ranata Dália e Prof.ª Dra Katia Simone Alves dos Santos**, agradeço por terem me apresentado e instruído no que seria minha maior vocação: a Endodontia. A cada procedimento ou aula ministrada de endodontia, carrego seus exemplos e ensinamentos.

Aos **Prof.ª Dra. Ana Flávia e Prof.º Dr. Cassiano Nonaka**, coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, pelo incentivo e apoio durante o doutorado.

*A todos os professores que fazem parte do PPGO-UEPB, por todos os ensinamentos transmitidos durante as aulas, palestras, conversas e parcerias. Em especial, às Prof.^a **Dra. Daliana Queiroga** e Prof.^a **Dra. Ana Flávia Granville Garcia**, por todo o conhecimento que me proporcionaram nas clínicas do LINCCO e pelos conselhos e sorrisos nas conversas mirabolantes.*

*À **UEPB**, que proporcionou toda minha formação acadêmica (Graduação, Mestrado e Doutorado). Sempre me lembrarei com carinho dos 11 anos nessa Instituição. Adquiri, nesse tempo, muitos conhecimentos e amigos que levarei para a vida. E quem sabe em breve possa retribuir tudo o que me foi oferecido.*

*Aos **funcionários do Departamento de Odontologia da UEPB**, em especial, à secretária do PPGO-UEPB, **Ahyanna Nóbrega**, pela atenção e disponibilidade em ajudar em todos os momentos.*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta pesquisa, muito obrigado!

RESUMO

Introdução: As lesões periapicais persistentes (LP2) desafiam a prática clínica, pela permanência de sinais e sintomas e pela resposta inadequada às terapias endodônticas convencionais, necessitando de possíveis intervenções cirúrgicas. As LP2 poderiam apresentar diferença nos mecanismos imunoinflamatórios em relação às primárias (LP1). **Objetivo:** Avaliar as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a imunexpressão de proteínas relacionadas ao *check point* imunológico (PD1 e PD-L1) em lesões periapicais persistentes e primárias. **Métodos:** 10 cistos radiculares primários (CR1), 10 cistos radiculares persistentes (CR2), 10 granulomas periapicais primários (GP1) e 09 granulomas periapicais persistentes (GP2) foram submetido à análise imunoistoquímica com anticorpos anti-CD8, CD4, PD-1 e PD-L1. A imunexpressão citoplasmática e/ou membranar das proteínas avaliadas nas LP1 e LP2 foi avaliada quantitativamente, contando células imunomarcadas e negativas em cinco campos microscópicos para PD1 e PD-L1 e células positivas para CD4+ e CD8+, e mediante somatória dos valores dos campos estabeleceu-se o percentual de positividade em relação ao total de células contadas e correlacionado com parâmetros morfológicos das lesões (infiltrado inflamatório e condição do epitélio cístico). **Resultados:** Nas LP2 predominaram linfócitos T CD8+ e T CD4+ quando comparado as LP1, porém sem diferença significativa. Considerando o comportamento clínico das lesões, a quantidade de linfócitos CD8 foi maior em LP2, com diferença significativa ($p=0,014$), principalmente nos CR2. A imunexpressão de PD-1 teve diferença significativa quanto ao comportamento clínico das LP2, principalmente em GP2 ($p=0,004$). A imunexpressão de PD-L1 teve diferença significativamente na cápsula cística entre CR2 e CR1 ($p<0,001$), como também, em relação ao comportamento clínico, com maior imunexpressão nos CR2 (citoplasma $p<0,001$ e núcleo $p=0,003$). Nas LP2 houve correlação positiva da imunexpressão citoplasmática de PD-L1 com linfócitos T CD8+, principalmente em GP2 ($r=0,881$ e $p=0,004$) e correlação da imunexpressão de PD-L1 em epitélio com linfócitos T CD4+ nos CR2 ($r=0,886$ e $p=0,001$). **Conclusões:** As LP2 revelam variações em seus constituintes celulares e comportamentos clínicos. Os resultados deste estudo sugerem um potencial microambiente citotóxico, com maiores quantidades de T CD8+ e uma regulação positiva da imunexpressão de PD-1/PD-L1 que tem como função básica a indução dos linfócitos reguladores para o processo de apoptose ou anergia, diminuindo assim a resposta defensiva do hospedeiro, frente a estas infecções persistentes.

Palavras-chave: Endodontia; Cisto Radicular; Granuloma Periapical; Retratamento; Linfócito CD4; Linfócito CD8; Proteína PD1; Proteína PD-L1.

ABSTRACT

Introduction: Persistent periapical lesions (PL2) are associated with persistent painful symptoms and progression of bone resorption processes, even after endodontic retreatment. It is believed that there is a difference in the microenvironment between persistent and primary periapical lesions. Mechanisms of evasion of the immune response may occur in infectious processes. Among the main ones is the union of the complex programmed cell death receptor (PD-1) and its PDL-1 ligand, which can also bind to T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) leading to a decrease in the proliferative capacity of lymphocytes as well as a lower production of cytokines by activated T cells, thus contributing to the creation of an immunosuppressive microenvironment in persistent periapical lesions. **Objective:** To evaluate the subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and the immunoeexpression of proteins related to the check point (PD1 and PD-L1) in persistent and primary periapical lesions, aiming to provide more information about the immunological mechanisms involved in the pathogenesis of these lesions. **Methodology:** Cross-sectional, observational study, 0 PD-1 and PD-L1 in 05 random fields of the epithelial lining (intraepithelial lymphocytes) and 05 fields of the connective tissue of the CRs capsule. In periapical granulomas, 05 random fields of greater immunoeexpression of these antibodies were evaluated. Counts of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes and immunopositive cells for PD-1 and PD-L1 were performed in each field, which were summed and the average number of immunopositive cells was estimated. Non-parametric Mann-Whitney and Spearman correlation tests were used for data analysis, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** grade III of inflammatory infiltrate predominated in all lesions CR1 (7/10 – 70%), CR2 (6/10 – 60%), GP1 (10/10 – 100%) and GP2 (7/9 – 77.8%). In CR2, 50% of the cases had atrophic epithelia and 50% hyperplastic epithelia. In CR1, hyperplastic epithelium predominated (70%). There were higher percentages of T CD8⁺ and T CD4⁺ lymphocytes in LP2, but the difference was not statistically significant. LP2 lesions showed higher percentages of CD8 immunoeexpression when compared to LP1, with a statistically significant difference ($p = 0.014$), mainly in CR2. There was a statistically significant difference in PD-1 immunoeexpression in GP2 when compared to CR2 ($p = 0.004$). PD-L1 showed a significant difference in immunoeexpression in the cystic capsule between CR2 and CR1 ($p = 0.000$), as well as, in relation to clinical behavior, with greater immunoeexpression in CR2 (cytoplasm $p = 0.000$ and nucleus $p = 0.003$). In PL2 there was a positive correlation of cytoplasmic PD-L1 immunoeexpression with T CD8⁺ expression in GP2 ($r = 0.881$ and $p = 0.004$) and correlation of PD-L1 immunoeexpression in epithelium with T CD4⁺ expression in

CR2 ($r= 0.886$ and $p = 0.001$). **Conclusion:** LP2 reveal variations in their cellular constituents and clinical behaviors. The results suggest a potential cytotoxic microenvironment, with greater amounts of T CD8+ and a positive regulation of PD-1/PD-L1 immunoeexpression, which has as its basic function the induction of regulatory lymphocytes for the process of apoptosis or anergy, thus decreasing the response host defense against these persistent infections.

Keywords: Endodontics; Radicular Cyst; Periapical granuloma; Retreatment; CD4 antigen; CD8 antigen; Programmed Cell Death Receptor 1; Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Do inglês, <i>Antigen Presenting Cell</i> , traduzido como Célula Apresentadora de Antígeno
CCR 5	Receptor CC-quimiocina 5
CD90	Do inglês <i>Cluster of Differentiation 90</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 90
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	Ciclooxigenase-2
CR	Cisto Radicular
CTLA-4	Do inglês <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> , traduzido como Linfócito T Citotóxico – antígeno 4
GP	Granuloma Periapical
HLA-DR	Do inglês <i>Human Leukocyte Antigens</i> , traduzido como sistema de histocompatibilidade humano
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LIE	Linfócitos Intraepiteliais
LP	Lesões Periapicais
LP1	Lesões Periapicais Primárias
LP2	Lesões Periapicais Persistentes
LPS	Lesões Periapicais Secundárias
MCP	Morte celular programada
MHC	Do inglês, <i>Main Histocompatibility Complex</i> , traduzido como Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Do inglês <i>Natural Killer</i> , traduzido como célula exterminadora natural
OPG	Osteoprotegerina
PD-1	Do inglês <i>Programmed Cell Death Receptor 1</i> , traduzido como proteína de morte Celular programada
PD-L1	Do inglês <i>Programmed Cell Death Proteina Ligand 1</i> , traduzido como Ligante da Proteína de Morte Celular Programada 1
PMN	Polimorfonucleares
RANK-L	Do inglês <i>Receptor Activator of Nuclear Factor B Ligand</i> , traduzido como do ligante receptor ativador do fator nuclear kappa B

REM	Restos Epiteliais de Malassez
TCR	Do inglês <i>T Cell Receptor</i> , traduzido como Receptor de Células T
TEFF	Células T Efetoras
TGF-β	Do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i> , traduzido como Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF-α	Do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> , traduzido como Fator de Necrose Tumoral Alfa
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba

LISTA QUADROS

Quadro 1 -	Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.....	33
Quadro 2 -	Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.....	34
Quadro 3 -	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários a serem utilizados no estudo.....	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Morte celular programada (MCP) e do antígeno-4 de linfócitos T citotóxicos na supressão da ativação de células T.....	28
Figura 2	Resistência adaptativa à imunidade tumoral mediada por PD-1 e PD L1	29
ARTIGO:		
Figura 1 -	Imunoexpressão de CD8 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×).....	62
Figura 2 -	Imunoexpressão de CD4 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×).....	63
Figura 3 -	BloxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti- T CD8, anti- T CD4, no revestimento epitelial (A) dos CRs e no infiltrado inflamatório (B) do tecido conjuntivo nas LPs primárias e persistentes.....	64
Figura 4 -	Imunoexpressão de PD1 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×).....	64
Figura 5 -	Imunoexpressão de PD-L1 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×).....	66
Figura 6 -	BloxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti- PD-1 (A), no infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo nas LPs persistentes e primárias.....	67
Figura 7 -	BloxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti-PD-L1 (citoplasma e núcleo) no revestimento epitelial (A) dos CRs e no infiltrado inflamatório (B) do tecido conjuntivo nas LPs primárias e persistentes.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	60
Tabela 2 -	Distribuição absoluta e relativa dos casos de lesões periapicais persistentes e primárias de acordo com os parâmetros clinicopatológicos..	60
Tabela 3 -	Tamanho da amostra, mediana, mínimo e máximo dos percentuais e significância estatística (P) para imunexpressão de T CD4, T CD8, PD1 e PD-L1 no revestimento epitelial (padrão do epitélio) dos CRs e no tecido conjuntivo dos CRs e GPs de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório, nas LPs persistentes e primárias.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	Considerações éticas	32
3.2	Caracterização do estudo	32
3.3	População	32
3.4	Amostra	32
3.5	Critérios de inclusão	32
3.6	Critérios de exclusão	33
3.7	Variáveis	33
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
4.1	Caracterização do estudo	36
4.1.1	<i>Método imunoistoquímico</i>	36
4.1.2	<i>Análise imunoistoquímica</i>	38
4.2	Análise estatística	39
5	ARTIGO	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE A – Ficha para coleta de dados referentes à análise da imunoexpressão de CD4, CD8 nos casos de GP1, GP2, CR1 e CR2	79
	APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados referentes à análise da imunoexpressão de PD1 e PD-L1 nos casos de GP1, GP2, CR1 e CR2	79
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB	81
	ANEXO B – Normas para submissão de artigos ao periódico <i>Journal of Endodontics</i>	84

1 INTRODUÇÃO

As Lesões Periapicais (LP) representam um grupo de processos patológicos inflamatórios de caráter agudo ou crônico. A LP pode ainda ser considerada como um fenômeno primário ou secundário. Esse grupo de lesões ocorre nos tecidos periapicais oriundo de um processo infeccioso no sistema de canais radiculares após a necrose do tecido pulpar. Destacam-se os microrganismos como principal fator etiológico, apesar de existir associação com fatores físicos e químicos (COHEN; HARGREAVES, 2017).

Quando uma infecção se dissemina pelo canal radicular, a região periapical torna-se sede de eventos inflamatórios, dando origem a uma LP (LOPES; SIQUEIRA, 2019). Com a permanência do estímulo, o processo inflamatório no ligamento periodontal associado à infecção pode desencadear a formação de um abscesso periapical (AP). Tal processo pode ainda dar origem a lesões crônicas, como o granuloma periapical (GP) e o cisto radicular (CR), consideradas como periodontites apicais crônicas (GARCÍA et al., 2007; MARÇAL et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014; LOPES, SIQUEIRA, 2015). Entre as características clínicas das LPs crônicas, tem-se a ausência de sintomatologia dolorosa, resposta negativa aos testes de vitalidade (térmicos) e sensibilidade (percussão), como também a presença de imagem radiolúcida, compatível com presença de reabsorção óssea na região adjacente ao dente afetado (COHEN; HARGREAVES, 2017; LOPES; SIQUEIRA, 2019).

As LPs podem ser classificadas como primárias e secundárias. As lesões periapicais primárias (LP1) são consideradas uma resposta inicial do organismo à necrose da polpa dentária e infecção do canal radicular. As lesões periapicais secundárias (LPS) permanecem ou reaparecem após a falha do tratamento dos canais radiculares, porém regredem após retratamento endodôntico. As lesões periapicais persistentes (LP2) permanecem mesmo após o retratamento endodôntico em que são identificadas e tratadas possíveis falhas da terapia inicial (COHEN; HARGREAVES, 2017; LOPES; SIQUEIRA, 2019).

Para as LP2 é necessário um tempo de proervação médio de 4 a 48 meses após re-intervenção endodôntica, pois é o período médio que o organismo leva para reparo tecidual ou formação da cicatriz periapical (NAIR, 2004; LOVE; FIRTH, 2009; ESTRELA et al., 2017). Além do tempo de proervação é necessário a presença de uma lesão radiolúcida com estabilização ou progressão de tamanho, associada a sinais e sintomas clínicos como dor, edema e parúlidade com exsudato persistente para se obter o diagnóstico de LP2 (ORTAVIK, 1996). Nestas situações, usualmente é indicada intervenção cirúrgica (DEL FABBRO et al., 2016; ESTRELA et al., 2017).

O retratamento endodôntico ou tratamento não cirúrgico sempre será prioritário diante do fracasso da terapia, entretanto, alguns fatores podem estar associados ao insucesso da terapia endodôntica inicial, incluindo a persistência da infecção intrarradicular, infecção extrarradicular, cistos verdadeiros (lesões císticas que não se comunicam com canal radicular) ou reação de corpo estranho (DEL FABBRO et al., 2016; LOPES, SIQUEIRA, 2019).

Estima-se que os índices de falhas dos tratamentos endodônticos primários sejam inferiores a 15% (AGNES, 2009; TABASSUM; KHAN, 2016; LOPES; SIQUEIRA, 2019). Por meio de uma revisão sistemática e metanálise foram avaliados os parâmetros globais de prevalência de LP, bem como a caracterização dos pacientes acometidos por estas infecções (TIBÚRCIO-MACHADO et al., 2021). A partir de 114 artigos, que avaliaram 34.668 pacientes, foi verificado prevalência de 52% de casos de LP nestes indivíduos. Em relação a LPs uma prevalência de 39% dentre os dentes tratados endodonticamente (TIBÚRCIO-MACHADO et al., 2021).

Em relação aos aspectos morfológicos, as LP, sejam primárias ou persistentes, podem se manifestar como (GP) ou (CR), ambos de origem inflamatória. Durante a fase crônica a mesma pode se apresentar assintomática, com resposta negativa aos testes de vitalidade (térmicos) e sensibilidade (percussão), como também a presença de imagem radiolúcida, compatível com a ocorrência de reabsorção óssea na região adjacente ao dente (LOPES; SIQUEIRA, 2019).

Os GPs são as lesões de origem inflamatória mais comumente diagnosticadas no complexo maxilofacial, representando entre 40,4% e 59,7% das lesões diagnosticadas histopatologicamente (BECCONSALL-RYAN et al., 2010; KOIVISTO; BOWLES; ROHRER, 2012). A perpetuação do processo inflamatório nos tecidos periapicais está associada com a reabsorção óssea e proliferação de um tecido conjuntivo fibrovascular. Comumente os GPs apresentam-se assintomáticos, radiograficamente caracterizados por uma área radiolúcida de tamanho variável, circular à oval, de margens bem definidas, com perda da lâmina dura na região apical do dente em questão (PEIXOTO et al., 2012; NEVILLE et al., 2016; WEBER et al., 2018; FRANÇA et al., 2019).

Considerado como uma lesão inflamatória crônica, o GP é constituído por uma reação de granulação e por uma variabilidade de células inflamatórias crônicas, incluindo linfócitos, plasmócitos, mastócitos e macrófagos, localizadas adjacentes ao periápice de um dente com polpa necrosada e canais infectados (NAIR, 2004; OMOREGIE et al., 2011; MARTÍN-GONZALES et al., 2015). García et al. (2007) demonstraram que nos GPs, comumente, se encontram ninhos/ilhas de células epiteliais quiescentes, denominados restos epiteliais de

Malassez (REM) (MUGLALI et al., 2008; LIN et al., 2009). Há uma combinação de diversos fatores que foram implicados na patogênese do GP como ciclo celular e apoptose, componentes inflamatórios (células polimorfonucleares e citocinas inflamatórias), fatores relacionados à matriz extracelular e fatores relacionados ao metabolismo ósseo (BERNARDI et al., 2015).

Há muita discussão em relação a patogênese do CR, porém algumas teorias ganharam destaque nas evidências. A teoria de Ten Cate (1972), referia que a formação cística era decorrente da falta de suporte nutricional. Segundo o autor, quando a proliferação celular interna do GP não recebe, por difusão, os nutrientes necessários para o metabolismo da lesão, os quais são advindos do tecido conjuntivo adjacente, ocorre degeneração e morte das células centrais do tecido por liquefação, o que provocaria uma cavitação no interior da lesão. Depois, Torabinejad (1983) relatou que a resposta humoral e celular, os eventos bioquímicos e celulares da inflamação e os moduladores da matriz extracelular pareciam estar envolvidos na formação e desenvolvimento das LP. Esta teoria fundamentou-se na expressão de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no epitélio de revestimento das lesões periapicais císticas, como também presença de imunoglobulinas como IgA e IgM no fluido do cisto. Dessa maneira, o autor contribuiu fortemente para elucidar a participação da resposta imunológica no desenvolvimento e regressão dos CRs.

Os CR desenvolvem-se em três fases: iniciação, formação e crescimento (FRANÇA et al., 2019). Na fase inicial, os REM proliferam em formações cordonais, ao serem continuamente estimulados por mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório, estabelecendo uma verdadeira rede epitelial no interior do granuloma apical. Na fase de formação cística desenvolve-se uma cavidade cística incipiente que pode ocorrer através do revestimento epitelial de área focal de destruição tecidual, devido a sua propriedade principal de pavimentar superfícies. Outra possibilidade é a formação cística dentro da massa de proliferação epitelial no granuloma apical pela degeneração e morte das células centrais (GARCIA et al., 2007; SHEAR; SPEIGHT, 2007; MUGLALI et al., 2008).

Em referência a epidemiologia dos CR, estes possuem a maior prevalência entre os cistos odontogênicos, correspondendo, a 71,6% deste grupo de lesões (MENDES et al., 2012; BERNARDI et al., 2015; HOSGOR et al., 2019). A maioria dos CRs são assintomáticos e diagnosticados em radiografias de rotina, em dentes desvitalizados e infectados. Em lesões de maiores proporções, podem ser evidenciados tumefação, sintomatologia à percussão e mobilidade dos dentes adjacentes. Radiograficamente, é notada uma perda de continuidade da lâmina dura, demonstrando uma imagem radiolúcida de formato ovalado a arredondado, de

tamanho variável, associada ao ápice da raiz do dente em questão (NEVILLE et al., 2016; CARVALHO; ESTRELA; FRANCO, 2021).

Quanto aos aspectos histopatológicos, o CR possui uma cavidade cística revestida parcial ou totalmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado. Esse epitélio é alicerçado por uma capsula de tecido conjuntivo fibroso que possui um infiltrado inflamatório crônico de intensidade variada (NEVILLE et al., 2016; BRITO et al., 2018). Inicialmente preconizada por Curry et al. (1998) e depois adaptada por Moreira et al. (2000) os CRs são subdivididos considerando o padrão de revestimento epitelial. Assim, podem ser categorizados em atróficos, os cistos que apresentavam predominantemente, em sua maior extensão, um revestimento epitelial constituído por 2 a 10 camadas de células, cujas interfaces epitélio/cápsula apresentavam-se planas. Já os hiperplásicos eram os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável e com interfaces epitélio/cápsula exibindo projeções arciformes. Embora CR possam apresentar-se clinicamente como lesões expansivas, estes podem mostrar episódios de quiescência. Apesar de não ser possível a identificação precisa de momentos de latência ou de crescimento, os CR podem ser classificados de acordo com o estado do epitélio cístico em atrófico ou hiperplásico, considerando-o como um parâmetro histopatológico confiável de atividade biológica (cisto ativos) e/ou inatividade do crescimento (cistos inativos) (MOREIRA et al., 2000).

As células inflamatórias envolvidas na patogenia das LPs são diversas, exercem funções específicas e em momentos determinados dos mecanismos imunológicos dessas lesões, produzindo, liberando e reagindo a uma série de mediadores inflamatórios. Algumas dessas células interagem em parceria com outras células inflamatórias e dos tecidos (ANDRADE et al., 2013; BRACKS et al., 2014; MÁRTON; KISS, 2014; BRAZ-SILVA et al., 2019).

Na diversidade de células inflamatórias que coabitam no microambiente das LPs merecem destaque os linfócitos, os quais são classificados em dois tipos: linfócitos T e linfócitos B. Os linfócitos T amadurecem no timo (linfócito T), os B em medula óssea importante também citar as células *Natural Killer* (células NK) (ANDRADE et al.; 2013; BRACKS et al., 2014).

Os linfócitos T participam da imunidade adaptativa e sua maturação ocorre no timo antes de serem implantados nos órgãos linfoides periféricos (linfonodos, baço e tonsilas), para posterior diferenciação mediada por antígenos (LUCKHEERAM et al., 2012). Essa maturação envolve a expressão de receptores de membrana para esses antígenos, podendo reconhecer as moléculas de histocompatibilidade (MHC) das células infectadas, ou seja, contendo peptídeos intracelulares pertencentes ao agente agressor. Assim, uma célula T madura é capaz de

reconhecer seletivamente os peptídeos antigênicos no interior das células, preservando a integridade celular (MOSER; LEO, 2010). As células T que realizam a identificação de antígenos apresentados pelas moléculas do MHC classe I (geralmente presentes em todas as células nucleadas no corpo) expressam uma molécula de superfície chamada CD8 (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2016).

Quando os antígenos são endossômicos, isto é, de origem extracelular e internalizados em geral por meio de fagocitose pelas células apresentadoras de antígenos (APC), seu reconhecimento é realizado por células T que expressam outra molécula de superfície, chamada CD4. As APCs expressam outra gama de moléculas de histocompatibilidade (MHC II) que se conectam a esses peptídeos endossômicos. Os linfócitos TCD4⁺ reconhecem então as moléculas do MHC de classe II, presentes apenas nas células inflamatórias (MOSER; LEO, 2010).

Assim, em geral, os antígenos intracelulares conectados às moléculas do MHC classe I são reconhecidos pelos linfócitos TCD8⁺, enquanto os antígenos extracelulares fagocitados pela APC e conectados às moléculas do MHC II são reconhecidos pelos linfócitos TCD4⁺. No entanto, essa especificidade de reconhecimento não parece ser tão rígida, pois, por exemplo, a ativação de linfócitos TCD8⁺ foi observada em situações nas quais antígenos de origem extracelular de fagócitos são capazes de deixar os fagossomos e permanecerem livres no citoplasma das células fagocíticas (MOSER; LEO, 2010). As células TCD4⁺, juntamente com as células TCD8⁺, constituem a maioria dos linfócitos T efetores (LUCKHEERAM et al., 2012).

As células TCD8⁺ efectoras têm ação citotóxica. Após reconhecer o complexo MHC classe I ligado a antígenos intracelulares em células com alterações funcionais (por exemplo, células neoplásicas) ou células infectadas, secretam proteínas que originam poros (perforinas) nas membranas celulares-alvo. Isso permite a passagem de granzimas, também secretadas pelas células TCD8⁺, que induzem a apoptose das células alvo. Por esse mecanismo, há inibição da replicação de microrganismos, principalmente vírus, bem como inibição do crescimento tumoral. As células TCD8⁺ também secretam TNF- α IFN (MOSER; LEO, 2010).

As células TCD4⁺, residentes em linfonodos periféricos, mudam de um estado não ativo (*naive*) para um estado efetor (auxiliar) quando entram em contato com citocinas e moléculas coestimuladoras secretadas por APCs. Estes estímulos são originados principalmente de células dendríticas no processo de maturação, que migram do tecido periférico para os linfonodos após internalizar os antígenos (MOSER; LEO, 2010). As células T auxiliares (Th) secretam uma ampla gama de citocinas, cuja predominância permite distinguir as diferentes classes de

resposta imune, possuindo funções essenciais na patogênese das LPs como: ação contra patógenos extracelulares, defesa contra infecções bacterianas e fúngicas e possível participação na formação dos granulomas (MOSER; LEO, 2010).

Os linfócitos T são abundantes nas LPs, mas a ativação dessas células ainda não é totalmente elucidada (IHAN-HREN; IFAN, 2009; FRAGA et al., 2013). Estudos prévios apontam que os padrões de resposta Th1 e Th2 ocorrem simultaneamente (SILVA et al., 2005; IHAN-HREN; IFAN, 2009). Sugere-se, assim, que a resposta imune Th1 esteja envolvida na progressão da lesão e na destruição óssea, enquanto o Th2 envolve mecanismos imunossupressores, importantes no processo de reparo, favorecendo o avanço do desenvolvimento das LPs (FRAGA et al., 2013). Em modelos de estudos experimentais, a ausência de citocinas Th1 não modifica significativamente o desenvolvimento da lesão, enquanto a carência de Th2 resulta em um aumento no tamanho da lesão (CÓLIC et al., 2009; FUKADA et al., 2009). No entanto, há um padrão caracterizado pela presença de IL-17, uma citocina diferente das tradicionais linhas Th1 e Th2 que é o padrão Th17, presentes nas LP (FRAGA et al., 2013).

A destruição óssea é uma característica comum das LPs causada pela liberação de mediadores que induzem a formação e ativação de osteoclastos durante a inflamação (JAKOVLJEVIC et al., 2015). O processo de reabsorção óssea no periápice é regulado por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , também como citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-4 (DESSAUNE NETO et al., 2018). A maioria dessas citocinas são reguladas em resposta às infecções bacterianas. O equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e as anti-inflamatórias controla o grau e o resultado da resposta imune do hospedeiro à estimulação do antígeno durante a inflamação crônica. Com isso, os mecanismos pró-inflamatórios devem ser adequadamente controlados para evitar a destruição excessiva do tecido (COLIĆ et al., 2009).

Quando as LPs são sintomáticas é sugerido que elas apresentam maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como a presença das interleucinas IL-1 β e IL-6, em comparação com lesões assintomáticas e tecidos saudáveis da polpa; e que também há indícios de variação nos níveis de citocinas pró inflamatórias entre o tipo de lesão periapical (JAKOVLJEVIC et al., 2015). Durante a LP, células T são abundantes, apesar de suas vias de ativação serem pouco conhecidas nestas lesões (BRAZ-SILVA et al., 2018). É sugerido que a IL-1, que é expressa por linfócitos CD4 (Th1 e Th2), seja mediador da reabsorção óssea e ativador de macrófagos (IHAN; HREN; IHAN, 2009). Macrófagos desempenham um papel no desenvolvimento e reparo dessas lesões, pois, são responsáveis por secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-

inflamatórias, como IL-1 α solúvel, TNF- α , IL-6, TGF- β e prostaglandinas (ANDRADE et al., 2013). Essas citocinas desempenham um papel na iniciação e regulação do processo inflamatório por meio da ativação e diferenciação de osteoclastos, ativação e proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e formação de novos vasos sanguíneos (ANDRADE et al., 2013; BRAZ-SILVA et al., 2018). Em fases tardias é visto um aumento de linfócitos T CD8, desempenhando um papel de regulação das lesões (SOL et al., 1998). O estudo de Estrela et al. (2017) demonstrou que o estágio da lesão (primária ou persistente), bem como o tipo histológico (GP ou CR), podem apresentar diferença imunológica, apresentando as LP2 um ambiente mais imunossupressor. E no caso de CR, os mesmos apresentam expressão de marcadores inflamatórios mais evidente em relação a GP (ESTRELA et al., 2016; WEBER et al., 2018).

O processo de degradação óssea na região perirradicular é modulado por citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que por sua vez, são reguladas em resposta à infecção bacteriana, e o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias controla a extensão e o resultado da resposta imune do hospedeiro à estimulação do antígeno durante o processo inflamatório crônico (ÁLVARES et al., 2018). As LP2 são lesões biologicamente ativas com altos níveis de ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL) e consequentemente potencial para reabsorção óssea (ESTRELA et al., 2017).

No estudo realizado por Estrela et al. (2016), com objetivo de analisar o perfil das células imunoinflamatórias e a expressão dos moduladores de reabsorção óssea (RANKL e OPG) em amostras de LP2, não foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas entre RANKL, OPG e células imunoinflamatórias ao comparar lesões periapicais persistentes classificadas histopatologicamente como CR e com aqueles classificados como GP. Em adição, uma significativa expressão de RANKL em comparação com OPG foi observada nas LP2. Assim que, além de seu papel na diferenciação e atividade dos osteoclastos, o sistema RANK-RANKL também pode afetar as respostas imunoinflamatórias, até mais que o OPG. Desta maneira, os autores sugerem que a LP2 são lesões biologicamente ativas, por demonstrarem potencial de reabsorção óssea e apresentarem um perfil de células imunoinflamatórias que sugere um ambiente supressivo e regulatório favorável a um comportamento clínico mais crônico (ESTRELA et al., 2016).

Os linfócitos são células que possuem receptores específicos para antígenos, desta forma eles tornam-se os principais mediadores da imunidade adquirida (ABBAS; LICHTMAN, 2016). No caso das células T, elas reconhecem fragmentos peptídicos de antígenos que estão ligados a MHC, com isso estas células são responsáveis pela imunidade celular (ABBAS;

LICHTMAN, 2016). Células T CD4 são chamadas de células auxiliares, porque também auxiliam na produção de anticorpos. Podem ser subdivididas em quatro categorias, Th1, Th2, Th17 e iTreg, elas reconhecem peptídeos apresentados em moléculas de CLASSE II do MHC, que são encontradas em antígenos (ZHU; PAUL, 2008; ABBAS; LICHTMAN, 2016). Além disso, possuem papel central na resposta imunológica do hospedeiro. São auxiliares das células B na produção de anticorpos, induzem macrófagos a desenvolverem atividade antimicrobiana, recrutam neutrófilos, eosinófilos e basófilos em locais em que exista atividade infecciosa ou inflamatória (ZHU; PAUL, 2008).

Células T CD8 são responsáveis pelo controle de patógenos e de células neoplásicas, possuindo também capacidade de produção de citocinas e quimiocinas, e em alguns casos atuam na indução de morte celular (BARBER et al., 2005; ABBAS; LICHTMAN, 2016). Isso ocorre, pois, destroem células infectadas com microrganismos intracelulares. Para exercerem suas funções, elas reconhecem e respondem a peptídeos codificados por patógenos exibidos por moléculas MHC de classe I em células infectadas ou em células que apresentam antígenos (HARING; BADOVINAC; HARTY, 2006). Após sua ativação, células T CD8 passam por quatro fases, a saber: reconhecimento do antígeno, ativação do linfócito, proliferação e diferenciação. Após a primeira fase, de reconhecimento antigênico, os linfócitos serão ativados e haverá uma resposta ao antígeno, provocando expansão clonal de células T antígeno específicas (HARING; BADOVINAC; HARTY, 2006). Em seguida, os linfócitos T CD8 deixam os órgãos linfóides secundários e percorrem os tecidos para exercer suas funções imunológicas, neste momento eles possuem baixa longevidade, entretanto contribuem para a eliminação de agentes patogênicos através de citólise gerada por perforina/granzima e pela produção de IFN- γ e TNF- α (HARING; BADOVINAC; HARTY, 2006). Cabe ressaltar o papel regulatório dessas células, pois, modulam outros leucócitos evitando a ativação imunológica excessiva e suas consequências patológicas (XU et al., 2016).

No caso das células Th1, há produção de IL-12 e IFN- γ que são citocinas que ajudam no controle de patógenos intracelulares e fatores de transcrição intracelular T-bet e STAT-4 são essenciais para a diferenciação e função celular Th1 (MERRETT et al., 1984; RUTERBUSCH et al., 2020). No caso de Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, promovem eosinofilia, mastocitose e hiperplasia de células de caliciformes, e são responsáveis por controle de agentes extracelulares (MERRETT et al., 1984; MERRETT et al., 1984; RUTERBUSCH et al., 2020). Os dois tipos de células T CD4 modulam a expressão de IL-1, e com isso podem atuar na reabsorção óssea e ativador de macrófagos em LPs (IHAN HREN; IHAN, 2009).

Na literatura observa-se uma variação entre os estudos sobre a população e papel dos linfócitos em LP. Acredita-se que essa variação seja em detrimento das variações nos critérios histológicos de avaliação (WANG et al., 2022). Estudos clássicos da literatura, como Phillipi et al. (2001) evidenciaram maior expressão de linfócitos T citotóxicos /supressores (CD8+) em LP com perfil agudo (abscessos e/ou LP agudizadas) do que LP com perfil clínico crônico. Para Gao et al. (1988), sobre disposição dos linfócitos nas LPs, a maioria estão localizados preferencialmente próximos ao revestimento epitelial e que os LTCD4+ foram observados ao redor do epitélio e os linfócitos T citotóxicos estavam na maioria das vezes, dentro do epitélio.

Matthews e Browne (1987) avaliaram a imunoexpressão do HLA-DR, CD4 e CD8 em cisto de origem odontogênica (cisto radicular, dentígero e ceratocisto odontogênico), constatando haver uma imunoexpressão do HLA-DR no epitélio de lesões císticas, bem como uma proporção de células T CD4:CD8 quase que semelhante entre as lesões (1,7:1; 1,9:1; 1,7:1; respectivamente), embora a expressão epitelial do HLA-DR não estivesse correlacionada com a expressão das células T. Zizzi et al. (2012), também constataram uma proporção quase semelhante de linfócitos T CD4/CD8 ao avaliarem o perfil dos linfócitos em cistos periapicais.

Os diversos subtipos de linfócitos T foram caracterizados e discutidos nas LPs tanto em humanos como em modelos animais (COLIC et al., 2009; ARAUJO-PIRES et al., 2014; SAMUEL et al., 2019). Stern et al. (1982) identificaram pela primeira vez linfócitos T em GP, denotando a possível participação destas células na patogenia das LPs. No entanto, estudos evidenciaram que nas LPs são identificadas mais células Th do que células T supressora/citotóxicas (CD8+). Linfócitos T CD4+ Th foram identificados nos diversos subtipos nas LPs, incluindo (células Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Tfh) e células Treg (NILSON et al., 1984; ARAUJO-PIRES et al., 2014).

Os Linfócitos intraepiteliais (LIE) se referem a uma população de linfócitos encontrados no tecido epitelial, principalmente no epitélio intestinal (KONIJINENBURG; MUCIDA, 2017). Essas células participam da resposta imune inata e adaptativa contra microrganismos patogênicos e processos imunorreguladores na mucosa intestinal (CHEROUTRE, LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011).

Os LIEs são classificados como naturais, sendo estes derivados do timo, e induzidos ou periféricos. LIEs naturais estão presentes desde o nascimento e pertencem às linhagens de células T $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$, que carregam o receptor de células T $\gamma\delta$ (TCR) e TCR $\alpha\beta$, respectivamente. As células TCR $\alpha\beta$ + convencionais que expressam as moléculas de superfície CD4 ou CD8 $\alpha\beta$ dão origem aos LIEs periféricos, após exposição a antígenos derivados de tecidos (KONIJINENBURG; MUCIDA, 2017).

Apesar da maioria dos estudos concentrar a investigação dos LIEs no epitélio do intestino e pele, essas células podem ser identificadas no epitélio de todas as mucosas e tecidos de proteção. No trato gastrointestinal, o intestino delgado proximal contém a maior concentração de LIEs, que diminui gradualmente em direção ao intestino delgado distal e ao cólon. Na pele, os LIEs em particular, células TCR $\gamma\delta$ ⁺ residentes no tecido, estão localizadas na epiderme. TCR $\gamma\delta$ ⁺ naturais, CD4⁺ e CD8⁺ e periféricas também foram identificadas nos brônquios, trato reprodutivo genital de homens e mulheres. Entretanto, existem algumas diferenças entre os LIEs localizados nos tecidos, por exemplo, os TCR $\gamma\delta$ ⁺ LIEs da pele (células T epidérmicas dendríticas) apresentam uma morfologia mieloide e são principalmente sésseis, enquanto os TCR $\gamma\delta$ ⁺ LIEs intestinais apresentam uma morfologia linfoide e são altamente móveis. A literatura carece de pesquisas que investiguem se essas diferenças traduzem em adaptações funcionais em cada tecido (KONIJINENBURG; MUCIDA, 2017).

Nas LP1 estudos prévios identificaram presença de LIEs em alguns ninhos epiteliais dentro de GPs e na maioria dos revestimentos epiteliais de cistos odontogênicos, incluindo os CRs. Assim, que o infiltrado inflamatório possui possível papel no desenvolvimento e crescimento dos CRs (GAO et al., 1988; ZIZZI et al., 2012). A partir deste pressuposto, evidencia-se a importância de estudar a expressão dos LIEs nas LP2 do tipo CR, já que não há estudos na literatura com essa investigação, isso deverá resultar em uma melhor compreensão do significado clínico das células imunológicas nestas lesões.

Dentre as principais vias de evasão da resposta imunológica está a união do complexo de (PD-1) e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 (SWANSO; SINHA, 2015; PAI; ZANDBERG; STROME, 2016), que também podem se ligar ao antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) levando a diminuição da capacidade proliferativa de linfócitos bem como menor produção de citocinas por células T ativadas, contribuindo, com isso, para a criação de um microambiente imunossupressor (SWANSO; SINHA, 2015).

A PD-1, também conhecida como CD279, foi descoberta pela primeira vez em linhagens celulares LyD9 (*murine hematopoietic progenitor*) e 2B4-11 (*murine T-cell hybridoma*) (ISHIDA et al., 1992). PD-1 é um tipo de proteína transmembrana de 55 kDa contendo 288 aminoácidos com um domínio N-terminal extracelular (IgV-Like), um domínio de permeação de membrana e uma cauda citoplasmática localizadas nas extremidades N e C, respectivamente, com duas bases de tirosina (NEEL et al., 2003; ARASANZ et al., 2017; SHARPE; PAUKEN, 2017). Considerada como um inibidor das respostas imunes adaptativa e inata é expresso em células T, B, (NK), macrófagos/monócitos e células dendríticas (ABBAS;

LICHTMAN, 2009; AHMADZADEH et al., 2009; HAN; LIU; LI, 2020). Também são altamente expressas em células T tumor-específicas (AHMADZADEH et al., 2009).

A PD-1 apresenta duas funções opostas, um papel usualmente desejável na redução da regulação de respostas imunes ineficazes, ou por outro lado, indesejavelmente, promovendo a manutenção da tolerância imunológica (SALMANINEJAD et al., 2018; HAN; LIU; LI, 2020).

Quando PD-1 se liga em seu receptor, PD-L1, ela irá influenciar a transdução de sinais em células T (ARASANZ et al., 2017). É um regulador negativo de células T, e sua presença é característica em lesões crônicas, onde existe exaustão de células T (DELGADO et al., 2019). Sendo assim, quando expressa, PD-1 pode estar envolvida em respostas imunossupressoras do organismo. Sinais da via PD-1 regulam a ativação inicial de células T, ajuste do destino e funções dessas células, tolerância celular T e retorno à homeostase imunológica (SHARPE; PAUKEN, 2017). Essa proteína também possui efeito modulador na produção de citocinas, com efeitos significativos na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2, o que regula respostas inflamatórias (KEIR et al., 2008). No caso de lesões periapicais crônicas, Delgado et al. (2019) demonstraram que a PD-1 e seu ligante PD-L1 são expressas de forma mais elevada nessas lesões, o que pode indicar esgotamento de células T durante essa fase da lesão e/ou aumento de resposta inflamatória.

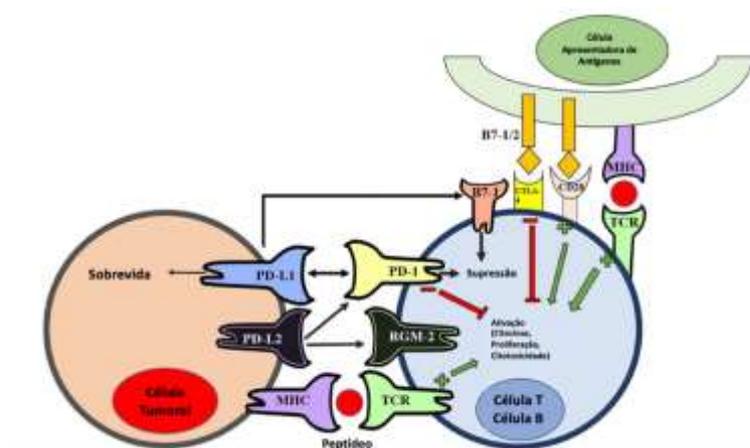
O PD-L1 é o ligante do receptor de morte programada 1, também conhecido como B7-H1 ou CD279, é uma glicoproteína de membrana tipo 1 de 33kDa que contém 29- aminoácidos com domínios Ig e IgC em sua região extracelular (SANMAMED; CHEN et al., 2014). O PD-L1 é expresso por macrófagos, alguns linfócitos T ativados, linfócitos B, células dendríticas, células apresentadoras de antígenos (APC) e algumas células epiteliais, especialmente sob processos inflamatórios (SHARPE et al., 2007). Além disso, o PDL-1 é expresso em células tumorais como um mecanismo imune adaptativo, para escapar das respostas antitumorais, pois induz apoptose de linfócitos T, quando ligado à PD-1, ocasionando baixa expressão de citocinas e consequentemente defasagem na produção de anticorpos (GHEBEH et al., 2006; WHERRY; KURACHI, 2015; OHAEBULAM et al., 2015; DELGADO et al., 2019). A expressão de PD-L1 é regulada por IFN- γ , IL-12, GM-CSF e IL-4 (WHERRY; KURACHI, 2015).

A via de sinalização PD-1/PD-L1 controla a indução e manutenção da tolerância imunológica dentro do microambiente tumoral. A atividade de PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 são responsáveis pela ativação de células T, proliferação e secreção citotóxicas no câncer para degenerar as respostas imunes antitumorais (HAN; LIU; LI, 2020). A literatura evidencia a regulação de vias da expressão e/ou sinalização de PD-1 /PD-L1 que possuem participação na modulação de sinais em células neoplásicas, possuindo papel na tumorigênese,

tais como: via P13K/AKT (SHARMA et al., 2017), via MAPK (PENG et al., 2018), via JAK-STAT (BANERJEE et al., 2017), via WNT (HARB; LIN; HAO, 2019), via NF-kB (LIM et al., 2016), via *Hedgehog* (WU et al., 2017).

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC-TCR) pode interagir juntamente B7-1/2-CD28 estimulando a ativação de células T. Simultaneamente o CTLA-4 pode ligar-se a B7-1/2 e mediar o sinal inibitório para prevenir a ativação das células T. A via de PD pode ser detalhada como 5 moléculas participantes, a saber: PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-1 (CD80) e RGM-2. PD-L1 e PD-L2 são ligantes de PD-1, e a ligação de PD-L1/PD-L2 com PD-1 leva à redução da ativação dos linfócitos T. Por outro lado, PD-L1 pode interagir com B7-1 (CD80) em células T ativadas para inibir a resposta dos linfócitos T. PD-L2 tem seu segundo receptor RGM-2. A interação PD-L2-RGM-2 medeia a tolerância imunológica, conforme observado na figura 1.

Figura 1 - Morte celular programada (MCP) e do antiígeno-4 de linfócitos T citotóxicos na supressão da ativação de células T.



Fonte: Adaptado de Ghosh et al. (2021).

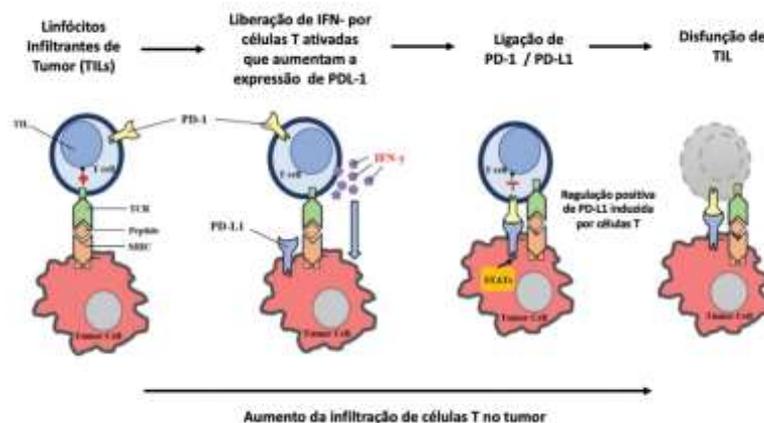
O estudo de PD-1 e PD-L1 são alvo de investigações na patogênica e tratamento de diversas doenças, tais como: câncer de mama (TARANTINO et al., 2021); câncer de pulmão (DANTOING et al., 2021); câncer colorretal (BURREN et al., 2021); câncer de intestino (WIRTA et al., 2020); câncer de bexiga. (YAN et al., 2022); câncer de pâncreas (QIAN et al., 2021); câncer de próstata (JUNKER et al., 2020); câncer de cabeça e pescoço (FOY et al., 2022); melanoma e osteossarcomas orais (ALVES et al., 2019). No tratamento de câncer de cabeça e pescoço, tratados com imunoterapia anti-PD-1 demonstraram maior sobrevivência que pacientes sem este controle (PAI; ZANDBERG; STROME, 2016). É relatado que células tumorais podem super expressar PD-1, aumentando o bloqueio de células T (ZOU; CHEN, 2008). Nesse contexto, há comprometimento da resposta imunológica, uma vez que as células

T desempenham papel fundamental nos mecanismos imunológicos, incluindo a secreção de citocinas que regulam tais mecanismos, como o IFN γ , TNF e IL-2 (BARBER et al., 2005).

Em doenças crônicas, os linfócitos são expostos permanentemente a antígenos, isso faz com que estas células percam funções efetivas, pois, passam a expressar múltiplos receptores (WHERRY; KURACHI, 2015). A exaustão celular T é frequentemente associada ao controle ineficiente de infecções e tumores persistentes (WHERRY; KURACHI, 2015). Nas LPs já foi relatada maior expressão de PD-1 em células T CD4⁺ (DELGADO et al., 2019). Em lesões periapicais crônicas, células T CD4 e CD8 são predominantes, todavia, o aumento exacerbado destes linfócitos pode significar uma resposta inflamatória indesejada (DELGADO et al., 2019). A identificação destes marcadores torna possível criar estratégias de mitigação de respostas inflamatórias graves de lesões periapicais persistentes.

Segundo Ghosh e colaboradores (2021), Teffs específicos do tumor entram no local do tumor para desenvolver linfócitos infiltrantes, após ativação inicial nos órgãos linfoides. Posteriormente ao reconhecimento de antígenos tumorais, os linfócitos infiltrantes de tumores liberam mediadores (citocinas) como o IFN- γ , que estimula a expressão de PD-L1 no microambiente tumoral. Ao ligar-se a PD-1, PD-L1 sinaliza a inativação de células T e elabora um sinal antiapoptótico às células tumorais, levando à disfunção das células T e à sobrevivência do tumor, conforme observado na figura 2.

Figura 2 – Resistência adaptativa à imunidade tumoral mediada por PD-1 e PD-L1.



Fonte: Adaptado de Ghosh et al. (2021).

O estudo de Iwai et al. (2002) reportou que células tumorais apresentam maior expressão de PD-L1, desta forma, este receptor estaria ligado a evasão imunológica das células neoplásicas. Nas LPs também foram demonstradas maior expressão desses receptores em

células T CD4, que podem modular a resposta imunológica (DELGADO et al., 2019). Em pacientes com lesões periapicais crônicas, as células T expressam níveis significativamente mais elevados de PD-1. A combinação de PD-1 e suas ligações, PD-L1 e PD-L2 podem prejudicar funções efetoras das células T, como proliferação, atividade citotóxica e produção de citocinas, levando a um fenótipo exaurido.

Delgado et al. (2019) avaliaram a expressão de PD1 e PDL-1 em lesões periapicais primárias e tecido gengival saudável. Os autores demonstraram que as lesões periapicais crônicas apresentam maior predominância de infiltrado linfocitário PD1 e PDL-1 e CTLA-4+ do que o grupo controle, podendo ser consideradas possivelmente como um ponto de verificação imune nas lesões periapicais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar por meio da imunohistoquímica as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 em LP1 e LP2.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil clínico (sexo, idade e localização anatômica das lesões) dos casos de lesões periapicais primárias e persistentes;
- Classificar histomorfologicamente em GPs e CRs os casos de lesões periapicais quanto a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como o padrão de revestimento epitelial nos CRs;
- Avaliar o perfil imunológico (CD4+/ CD8+) e a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 em linfócitos T do tecido conjuntivo de GPs e CRs primários e persistentes;
- Verificar o perfil imunológico (CD4+ / CD8+) e a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 de linfócitos intraepiteliais de CRs primários e persistentes;
- Identificar o perfil de imunexpressão de PD-L1 em células do revestimento epitelial de CRs primários e persistentes;
- Analisar o perfil imunológico (CD4+ / CD8+) e a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 de linfócitos T no tecido conjuntivo em relação aos parâmetros histomorfológicos GPs e CRs primários e persistentes;
- Analisar o perfil imunológico (CD4+ / CD8+) e a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 de linfócitos intraepiteliais em relação aos parâmetros histomorfológicos dos CRs primários e persistentes;
- Analisar a imunexpressão de PD-L1 em células epiteliais do epitélio cístico em relação aos parâmetros histomorfológicos dos CRs primários e persistentes.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e em seguida, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), obedecendo aos critérios da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, aprovado, conforme parecer: 5.839.503.

3.2 Caracterização do estudo

O estudo consistiu-se em uma pesquisa transversal, observacional que avaliou a presença de subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a expressão de PD-1 e PD-L1 em uma série de casos de GP e CR primários e persistentes.

3.3 População

A população do presente estudo foi constituída de casos de GP e CR, diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, cujos parâmetros clínicos permitiram classificá-los em LP primárias e persistentes.

3.4 Amostra

Foi selecionada por conveniência, do tipo não probabilística, constituída por 20 casos de lesões periapicais primárias (10 GP / 10 CR) e 19 casos de lesões periapicais persistentes (09 GP / 10 CR).

3.5 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas casos de GP e CR primários e persistentes, que apresentaram material biológico suficiente para realização das análises morfológicas e imunoistoquímicas. Foram selecionados apenas os casos cujas informações clínicas e radiográficas determinassem o diagnóstico de lesões persistentes e primárias.

3.6 Critérios de exclusão

Foram excluídos nas LP2 os casos cujos prontuários não apresentaram histórico prévio de retratamento endodôntico não-cirúrgico com proervação mínima de quatro meses e que não estavam associados com sinais e sintomas como dor, edema e/ou presença de parúlidade. Casos que apresentaram envolvimento de mucosa sinusal e que foram provenientes de biópsia incisional também foram excluídos. GP que porventura apresentassem vestígios de epitélio odontogênico no tecido conjuntivo, foram excluídos da pesquisa.

3.7 Variáveis

As variáveis independentes e dependentes que foram analisadas no presente estudo estão listadas nos quadros, a seguir.

Quadro 1 - Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Tipo de lesão	Classificação das lesões periapicais crônicas de origem inflamatória primárias e persistentes.	- GP - CR
Infiltrado inflamatório	Intensidade do infiltrado de células inflamatórias presente no tecido conjuntivo dos GP e da cápsula dos CR.	- Grau I - Grau II - Grau III
Revestimento epitelial dos CR	Condição histopatológica do revestimento epitelial dos CR.	- Atrófico - Hiperplásico

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Quadro 2 - Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
CD4+	Topografia da imunoposição do anticorpo anti-CD4.	Citoplasma/membrana
Distribuição dos linfócitos intraepiteliais CD4+	Distribuição predominante dos linfócitos T intraepiteliais CD4+ nas camadas epiteliais dos CRs e de linfócitos T CD4+ em tecido conjuntivo de GPs e CRs.	<ul style="list-style-type: none"> • Imunomarcção em camada basal / parabasal; • Imunomarcção em camada parabasal / superficial; • Imunomarcção em camada superficial; • Imunomarcção em toda a extensão do revestimento epitelial. • Imunoexpressão focal ou difusa em linfócitos do tecido conjuntivo de GP e CR.
Média de linfócitos T CD4+ em epitélio (intraepiteliais) e em tecido conjuntivo	Média de linfócitos T CD4+ intraepiteliais e em tecido conjuntivo da amostra avaliada.	• Média de células imunopositivas em citoplasma/membrana
CD8+	Topografia da imunoposição do anticorpo anti-CD8.	• Citoplasma
Distribuição dos linfócitos intraepiteliais CD8+	Distribuição predominante dos linfócitos T intraepiteliais CD8+ nas camadas epiteliais dos CRs e de linfócitos T CD8+ em tecido conjuntivo de GPs e CRs.	<ul style="list-style-type: none"> • Imunomarcção em camada basal / parabasal; • Imunomarcção em camada parabasal / superficial; • Imunomarcção em camada superficial; • Imunomarcção em toda a extensão do revestimento epitelial. • Imunoexpressão focal ou difusa em linfócitos do tecido conjuntivo de GP e CR.
Média de linfócitos T CD8+ em epitélio (intraepiteliais) e em tecido conjuntivo	Média de linfócitos T CD8+ intraepiteliais e em tecido conjuntivo da amostra avaliada.	• Média de células imunopositivas em citoplasma/membrana
PD-1	Topografia da imunoposição da proteína PD-1.	<ul style="list-style-type: none"> • Citoplasma • Núcleo • Ambos

Distribuição da imunexpressão da proteína PD-1	Distribuição predominante da imunexpressão da proteína PD-1 em linfócitos intraepiteliais do limitante epitelial de CRs e em linfócitos do tecido conjuntivo da cápsula dos CR e GPs.	<ul style="list-style-type: none"> • Imunoexpressão em camada basal / parabasal; • Imunoexpressão em camada parabasal / superficial; • Imunoexpressão em camada superficial; • Imunoexpressão em toda a extensão do revestimento epitelial. • Imunoexpressão focal ou difusa em linfócitos do tecido conjuntivo de CR e GP.
PD-L1	Topografia da imunexpressão da proteína PD-L1.	<ul style="list-style-type: none"> • Citoplasma • Núcleo • Ambos
Distribuição da imunexpressão da proteína PD-L1	Distribuição predominante da imunexpressão da proteína PD-L1 em linfócitos intraepiteliais do limitante epitelial de CRs e/ou células epiteliais do limitante cístico de CRs, em linfócitos do tecido conjuntivo da cápsula dos CR e GPs.	<ul style="list-style-type: none"> • Imunoexpressão em camada basal / parabasal; • Imunoexpressão em camada parabasal / superficial; • Imunoexpressão em camada superficial; • Imunoexpressão em toda a extensão do revestimento epitelial. • Imunoexpressão focal ou difusa em linfócitos do tecido conjuntivo de CR e GP.
Percentual de imunexpressão de PD-1 em epitélio (linfócitos intraepiteliais) e em tecido conjuntivo	Percentual de células imunopositivas para PD-L1 em epitélio (linfócitos intraepiteliais e células epiteliais), bem como em linfócitos do tecido conjuntivo da cápsula dos CRs e dos GPs.	<ul style="list-style-type: none"> • Percentual de células imunopositivas em citoplasma/membrana

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

4 ESTUDO MORFOLÓGICO

Para o desenvolvimento do estudo morfológico, foi realizada uma avaliação dos aspectos histomorfológicos dos casos selecionados em microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*) nos aumentos 40X, 100X e 400X, com cortes de 5µm de espessura e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). A intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como a condição do revestimento epitelial nas lesões císticas foram os aspectos histopatológicos analisados. Um Patologista Oral experiente realizou a análise histomorfológica e os dados foram transcritos para uma ficha previamente elaborada para o estudo.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com critérios de Peixoto et al. (2012). A partir da porção central dos GPs e da região luminal das lesões císticas em direção à periferia, foi considerado um campo microscópico, sob o aumento de 200X. Os espécimes cujo infiltrado inflamatório se apresentou restrito à um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I; as lesões com células inflamatórias presentes em dois terços definidas como de grau II; e as lesões que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços categorizadas de grau III.

Nos casos de CRs, a condição do revestimento epitelial foi analisada de acordo com metodologia proposta por Moreira et al. (2000). Com base na condição predominante de cada caso, classificados como atróficos os cistos que apresentaram em sua maior extensão o revestimento epitelial constituído por 2 a 10 camadas de células de espessura, e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial plana. Adicionalmente, foram considerados como hiperplásicos, os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células formando projeções ondulares e interface arciforme entre a cápsula e o revestimento epitelial.

4.1 Estudo imunoistoquímico

4.1.1 Método imunoistoquímico

A amostra foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente limpas e desengorduradas e preparadas com adesivo à base de 3 aminopropyltriethoxy-silano (Sigma-Aldrich Chemical CO, St Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada

em polímeros de dextrano (*EnVision™ Flex+*, *Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), utilizando os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-PD-1 e anti-PD-L1 (QUADRO 3). O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário no protocolo imunistoquímico. O controle positivo consistiu em cortes de tonsilas para CD4, CD8, PD-1 e PD-L1. A técnica utilizada seguiu protocolo do Laboratório de Imunistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB, conforme descrito a seguir:

- Desparafinização: 2 banhos em xilol aquecido (10 minutos cada);
- Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos)
- Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- Recuperação antigênica (QUADRO 3);
- 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*), 4° em câmara úmida (Quadro 4);
- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo secundário polimerizado à peroxidase [(*Amplifier, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA*)], 4° em câmara úmida (30 minutos);
- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate system, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*) (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Harris, à temperatura ambiente (1,5 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- Montagem em polímeros de acrilatos (*Entellan® new, Merck KGaA Darmstadt, DE*).

Quadro 3 - Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Anti-CD4	0.N.52	SantaCruz Biotechnology	1:200	Steamer, Citrato, pH 6.0, 60 min, 90°C	Overnight
Anti-CD8	SP16	Thermo Scientific.	1:100	Steamer, Citrato, pH 6.0, 60 min, 90°C	Overnight
Anti-PD-1	MAA751Hu21	Cloud-clone	1:200	Steamer, Citrato, pH 6.0, 60 min, 90°C	Overnight
Anti-PD-L1	MAA788Hu22	Cloud-clone	1:3000	Steamer, Citrato, pH 6.0, 60 min, 90°C	Overnight

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

4.1.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, as lâminas foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (*MoticEasyScan Pro 6, Motic Inc., Richmond, BC, CAN*) e, posteriormente, visualizadas no programa *DSAssistant (Motic*

Inc., Richmond, BC, CAN). Dois examinadores previamente treinados realizaram as análises imunoistoquímicas, sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. As imunorexpressões das proteínas relacionadas aos linfócitos (T CD4 e CD8) e ao *check point* imune (PD1 e PDL-1) foram avaliadas nos CR e GP primários e persistentes. Para todas as proteínas descritas anteriormente, as expressões foram analisadas, separadamente, no citoplasma/membranar e no núcleo dessas células.

Com base em uma adaptação da metodologia utilizada no estudo de Brito *et al.* (2018), foi realizada uma análise quantitativa da imunorexpressão de CD4+, CD8+, PD1 e PD-L1. Sob aumento de 100× (*DSAssistant, Motic Inc.*, Richmond, BC, CAN), foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos. Posteriormente, sob aumento de 400× (*DSAssistant, Motic Inc.*, Richmond, BC, CAN), foram fotomicrografados cinco campos na região central das lesões. Em seguida, com o auxílio do programa *ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA)*, foi realizada a contagem das células imunomarcadas e negativas em cada um dos campos microscópicos para PD1 e PD-L1 e apenas as células positivas para CD4+ e CD8+. Os valores obtidos em cada um desses campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de positividade em relação ao total de células contadas. Os dados obtidos na análise imunoistoquímica foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A e B).

4.2 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da análise clínica, morfológica e imunoistoquímica foram registrados em banco de dados no *Statistical Program Software - SPSS® (versão 25.0; SPSS Inc., Chicago, USA)*, no qual foram processadas as análises estatísticas. Inicialmente foi realizada caracterização da amostra de forma descritiva.

Os dados provenientes da análise das imunorexpressões de CD4+, CD8+, PD-1 e PD-L1 foram avaliados por meio do 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 essas proteínas em relação aos grupos lesões e às características histopatológicas de GP e CR. Possíveis correlações entre as imunorexpressões das proteínas relacionadas ao *check point* foram avaliadas por meio do teste de *Spearman*. Devido aos baixos percentuais de imunopositividade para PD1 e PD-L1 em citoplasma e membrana, os dados referentes à expressão dessas proteínas foram analisados

apenas por meio de estatística descritiva. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 ARTIGO

Apresentação

O projeto de pesquisa foi desenvolvido e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Mediante execução desse projeto, um artigo é apresentado nesta tese: “**Imunoexpressão de linfócitos (CD4+ e CD8+) e proteínas do *check point* imune (PD-1 e PD-L1) em lesões periapicais persistentes e primárias**”.

O artigo será submetido ao periódico *Journal of Endodontics* (ISSN: 1878-3554; Fator de impacto: 4.986; Qualis Odontologia A1), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

ARTIGO A SER SUBMETIDO**IMUNOEXPRESSÃO DE LINFÓCITOS (CD4+ E CD8+) E PROTEÍNAS DO CHECK POINT IMUNE (PD-1 E PD-L1) EM LESÕES PERIAPICAIS PERSISTENTES E PRIMÁRIAS****Autores:**

Robeci Alves Macêdo Filho^I, Wliana Pontes de Lima^I, Pollianna Muniz Alves^{II}, Cassiano Francisco Weege Nonaka^{II}, Manuel Antonio Gordón-Núñez^{II}

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

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

Autor correspondente:

Manuel Antonio Gordón-Núñez

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 Fone/ Fax: +55 83 3315-3471

E-mail: gordonnunez162531@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Persistent periapical lesions challenge the clinical practice due to the permanence of signs and symptoms and the inadequate response to conventional endodontic therapies, requiring possible surgical interventions. It is believed that these lesions may present differences in immunoinflammatory mechanisms when compared with primary periapical lesions. **Objective:** To evaluate the subpopulations of CD4+ and CD8+ T lymphocytes and the immunoreexpression of checkpoint-related proteins (PD1 and PD-L1) in persistent and primary periapical lesions. **Methods:** A sample of 10 primary radicular cysts (CR1), 10 persistent radicular cysts (CR2), 10 primary periapical granulomas (GP1) and 09 persistent periapical granulomas (GP2) was submitted to immunohistochemical analysis using anti-CD8, CD4, PD1 and PD-L, in relation to morphological parameters (Inflammatory infiltrate and cystic epithelium pattern). **Results:** In persistent lesions, T CD8+ and T CD4+ lymphocytes predominated, but with no statistically significant difference. Considering the clinical behavior of the lesions, CD8 immunoreexpression was higher in LP2, with a statistically significant difference ($p=0.014$), especially for CR2. PD-1 immunoreexpression had a statistically significant difference regarding the clinical behavior of LP2, mainly in GP2 ($p=0.004$). PD-L1 immunoreexpression was significantly different in the cystic capsule between CR2 and CR1 ($p<0.001$), as well as, in relation to clinical behavior, with greater immunoreexpression in CR2 (cytoplasm $p<0.001$ and nucleus $p=0.003$). In PL2 there was a positive correlation of cytoplasmic immunoreexpression of PD-L1 with CD8+ T lymphocytes, mainly in GP2 ($r=0.881$ and $p=0.004$) and correlation of PD-L1 immunoreexpression in epithelium with CD4+ T lymphocytes in CR2 ($r=0.886$ and $p=0.001$). **Conclusions:** LP2 (GP2 and CR2) reveal variations in their cellular constituents and clinical behavior. The results of this study suggest a potential cytotoxic microenvironment, with greater amounts of T CD8+ and a positive regulation of PD-1/PD-L1 immunoreexpression, which has as its basic function the induction of regulatory lymphocytes for the process of apoptosis or anergy, thus decreasing the defensive response of the host to these persistent infections.

Keywords: Endodontics. Radicular Cyst. Periapical Granuloma. Retreatment. CD4 Antigen. CD8 Antigen. PD1 Protein. Programmed Cell Death 1 Receptor. PDL-1 Protein. Programmed Cell Death 1 Ligand.

INTRODUÇÃO

As lesões periapicais (LP) podem ser classificadas em primárias ou secundárias, do ponto de vista clínico e radiográfico.¹⁻³ As lesões periapicais primárias (LP1) são consideradas uma resposta inicial do organismo à necrose da polpa dentária e infecção do canal radicular. Já lesões periapicais secundárias (LPS) permanecem ou reaparecem após uma intervenção endodôntica primária. Dentre as LPS, destacam-se as lesões emergentes, quando estavam ausentes e se desenvolveram após o tratamento, persistentes (LP2), que permaneceram mesmo após o retratamento endodôntico e recorrentes, quando aparecem tardiamente ao tratamento inicial.^{1,2,4}

Para as LP2 é necessário um tempo de preservação médio de 4 a 48 meses após reintervenção endodôntica, pois é o período médio que o organismo leva para reparo tecidual ou formação da cicatriz periapical^{3,5,6}. Além do tempo de preservação é necessário a presença de uma lesão radiolúcida com estabilização ou progressão de tamanho, associada a sinais e sintomas clínicos como dor, edema, e parúlide com exsudato persistente para se obter o diagnóstico de LP2⁷. Nestas situações, usualmente é indicada intervenção cirúrgica.^{3,8}

Dentre as LP, seja primária, secundária e/ou persistente, destacam-se os granulomas periapicais (GP) e cistos radiculares (CR) que representam um espectro de respostas inflamatórias à necrose pulpar, estas lesões podem ser desencadeadas por uma variedade de agentes, incluindo patógenos microbianos infecciosos.^{1,4} Os linfócitos são as células inflamatórias predominantes nas LP, seguidos por macrófagos, plasmócitos e neutrófilos.⁹ Embora controversa, a diferença na intensidade do infiltrado inflamatório entre LP2 e LP1 sugere a possível existência de dois estágios de desenvolvimento da mesma lesão.^{2,3}

Particularidades imunológicas podem diferenciar LP1 das LP2, como maior expressão da proteína CD90 em LP1, em associação à presença de células inflamatórias crônicas, tais como macrófagos, enquanto em LP2, COX-2 é a proteína mais expressa, relacionada a infiltrados inflamatórios agudos³. Também é evidenciada maior concentração de células T reguladoras em lesões persistentes, que por sua vez pode afetar a expressão do receptor ativador do fator nuclear kappa β ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), implicando em maior desregulação dos processos de reabsorção óssea em LP2.²

Os linfócitos T, que são mediadores essenciais do recrutamento de leucócitos, também estão implicados nas respostas aos patógenos das LP.² Alterações nas subpopulações dessas células tem um impacto significativo e complexo no microambiente imunológico e na regulação de citocinas, desencadeando a reação inflamatória e a degradação tecidual. Subtipos de células T e citocinas foram identificadas e elucidadas nas LP.¹⁰⁻¹² Em um trabalho inicial¹³ identificou-se, pela primeira vez, linfócitos T em GP, denotando a possível participação destas células na patogenia das LPs. No entanto, estudos evidenciaram que nas LPs são identificadas mais células Th do que células T supressora/citotóxicas (CD8+). Diversos subtipos de linfócitos T foram identificados nas LPs, incluindo células Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Tfh e células Treg.^{10,11}

Existem evidências apontando que LPs, principalmente as persistentes, como “biologicamente ativas”, e sendo caracterizadas pela presença de células imunoinflamatórias, sugerindo um ambiente supressivo e regulatório favorável a um comportamento clínico mais agudo². Além disso, tecidos de LPs, quando comparados a tecido gengival saudável, são mais infiltrados por linfócitos e expressam mais Proteína de Morte Celular Programada a PD-1 e PD-

L1, bem como a presença de mediadores inflamatórios (IFN- γ , TGF- β , IL-10 e TNF- α)¹⁴. PD-1 é predominantemente expressa em células T ativadas e considera-se um importante agente imunológico receptor de *checkpoint*, regulador da atividade de células T efetoras nos tecidos e limitadora da sua atividade lítica em tumores. A PD-1 transmite sinais inibitórios para células T após ligação com seus ligantes (PDL-s)¹³.

A via PD-1/PD-L1 controla a indução e manutenção da tolerância imunológica dentro do microambiente. A atividade de PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 são responsáveis pela ativação de células T, proliferação e secreção citotóxicas no câncer para degenerar as respostas imunes antitumorais.¹⁵ A literatura evidencia a regulação de vias da expressão e/ou sinalização de PD-1 /PD-L1 que possuem participação na etiopatogênese e tratamento de câncer de mama;¹⁶ câncer de pulmão;¹⁷ câncer colorretal;¹⁸ câncer de intestino;¹⁹ câncer de bexiga;²⁰ câncer de pâncreas;²¹ câncer de próstata;²² câncer de cabeça e pescoço²³; osteossarcoma oral⁴⁵ e liquen Plano.⁴⁶

Em doenças crônicas, os linfócitos são expostos permanentemente a antígenos, isso faz com que estas células percam funções efetoras, pois, passam a expressar múltiplos receptores²⁴. A exaustão de linfócitos T é frequentemente associada ao controle ineficiente de infecções persistentes²⁴. Nas LPs já foi relatada maior expressão de PD-1 em células T CD4+¹⁴. Nas LP1 as células T CD4 e CD8 são predominantes, todavia, o aumento exacerbado destes linfócitos pode significar uma resposta inflamatória indesejada¹⁴. A identificação destes marcadores torna possível criar estratégias de mitigação de respostas inflamatórias graves de LP2.

Desta forma, as LP2 apresentam em comum a persistência dos sinais e sintomas da inflamação que não respondem adequadamente a terapia endodôntica convencional.¹⁻³ Diante disso, acredita-se que estas lesões apresentam um comportamento imuno-inflamatório diferente das LP1.¹⁻³ Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a imunoexpressão dos linfócitos T CD8+, T CD4+ e das proteínas do *check point* imune PD1 e PD-L1 entre LP1 e LP2.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A amostra foi constituída por 19 casos de LP2 (09 GP2 + 10 CR2) e 20 casos de LP1 (10 GP1 + 10 CR1), diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) Campina Grande – PB. Foram incluídos na amostra, apenas casos de GP e CR, que apresentaram material biológico suficiente para realização dos estudos morfológicos e imunoistoquímicos.

Especificamente para os LP2 (GP2 e/ou CR2) foram excluídos do estudo os casos sem a informação do tempo de retratamento endodôntico para as LP2 (mínimo 4 meses) e que não estavam associados com sinais e sintomas como dor, edema e/ou presença de parúlides. Casos que apresentaram envolvimento de mucosa sinusal e que foram provenientes de biópsia incisional também foram excluídos. GP que porventura apresentassem vestígios de epitélio no tecido conjuntivo, foram excluídos da pesquisa. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB, Campina Grande, Brasil (Parecer nº 5.839.503).

Análise morfológica

A partir do material embocado em parafina, cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos, estendidos em lâminas de vidro e posteriormente corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina. Em sequência, um patologista oral experiente realizou as análises morfológicas sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*). A intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo/cápsula, bem como a condição do revestimento epitelial (atrófico / hiperplásico) nas lesões císticas foram os aspectos histológicos analisados.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada de acordo com critérios estabelecidos por Peixoto.²⁵ A partir da porção central dos GPs e da região luminal das lesões císticas em direção à periferia, foi considerado um campo microscópico, sob o aumento de 200x. Os espécimes cujo infiltrado inflamatório se apresentou restrito à um terço do campo microscópico, foram classificados como grau I; as lesões com células inflamatórias presentes em dois terços foram definidas como de grau II; e as lesões que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços foram categorizadas de grau III.

Nos casos de CRs, a condição do revestimento epitelial foi analisada de acordo com metodologia proposta por Moreira.²⁶ Com base na condição predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os cistos que apresentaram em sua maior extensão o revestimento epitelial constituído por 2 a 10 camadas de células de espessura, e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial plana. Adicionalmente, foram considerados como hiperplásicos, os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células formando projeções ondulares e interface arciforme entre a cápsula e o revestimento epitelial.

Imunoistoquímica

As amostras selecionadas, fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina, foram submetidas a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base 3aminopropyltriethoxy-silano (Sigma-Aldrich Chemical CO, St Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*EnVision™ Flex+*, *Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), utilizando os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-PD-1 e anti-PD-L1 (Tabela 1). Em sequência, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após incubação com anticorpos primários anti-CD4, anti-CD8, anti-PD1 e anti-PD-L1 (Tabela 1), os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe Plus™*, *Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA*). A atividade da peroxidase foi visualizada por meio 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 contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula.

Como controle positivo foram utilizados cortes histológicos de tonsila, para os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-PD1 e anti-PD-L1. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo imunoistoquímico.

Análise imunoistoquímica

A imunoexpressão das células imunoinflamatórias (CD4+ e CD8+) e as proteínas relacionadas ao *check point* (PD1 e PD-L1) nas LPs primárias (GP1 e CR1) e persistentes (GP2 e CR2) foi avaliada, de forma quantitativa em 05 campos. A análise da expressão das proteínas foi realizada, em citoplasma e membrana. Considerou-se como positividade a coloração acastanhada independentemente de sua intensidade.

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, as lâminas foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (*MoticEasyScan Pro 6*, *Motic Inc., Richmond, BC, CAN*) e, posteriormente, visualizadas no programa *DSAssistant* (*Motic Inc., Richmond, BC, CAN*). Dois examinadores previamente treinados realizaram as análises imunoistoquímicas, sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. Com o auxílio do programa *ImageJ®* (*Image Processing and Analysis in Java, National*

Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA), foram contadas todas as células imunomarcadas e células negativas em cada campo selecionado. Posteriormente, foi calculado o percentual de células exibindo positividade em relação ao total de células contadas.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; *IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Os dados provenientes da análise das imunorexpressões de CD4+, CD8+, PD1 e PD-L1 foram avaliados por meio do 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 essas proteínas em relação aos grupos lesões e às características histopatológicas de GP e CR. Possíveis correlações entre as imunorexpressões das proteínas relacionadas ao *check point* foram avaliadas por meio do teste de Spearman. Devido aos baixos percentuais de imunopositividade para PD1 e PD-L1 em citoplasma e membrana, os dados referentes à expressão dessas proteínas foram analisados apenas por meio de estatística descritiva. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Análise morfológica

A análise morfológica do infiltrado inflamatório nas LPs revelou predominância do grau inflamatório tipo III para todas as lesões CR1 (7/10 - 70%) CR2 (6/10 -60%) GP1 (10/10 - 100%) GP2 (7/09 -77,8%). Por sua vez, a análise do revestimento epitelial nas lesões císticas, revelou nos CR2, 5 (50,0%) casos com epitélio atrófico, 5(50,0%) casos com epitélio hiperplásico. Em relação, CR1 houve um predomínio no epitélio hiperplásico em 7(70,0%) (Tabela 2).

Imunorexpressão de CD8

Nos GP, foi observada imunopositividade citoplasmática e membranar para CD8 distribuída de forma predominantemente difusa em linfócitos T de 10 casos de GP1 (100%; mediana: 23,00; variação: 6,20% – 60,40%) e em 08 casos de GP2 (88,8%; mediana: 30,60; variação: 0,00% – 78,40%) (Figura 1 – A, B). Observou-se discreto maior percentual da

imunoposição de CD8 nos GP2 em relação ao GP1, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos dessa lesão ($p = 0,477$) (Figura 3 - B).

Foi observada imunopositividade citoplasmática e membranar para CD8 distribuída de forma predominantemente difusa em linfócitos T intraepiteliais principalmente nas camadas suprabasais, nos 10 casos de CR1 (100%; mediana: 1,60; variação: 0,00% – 5,20%) e nos 10 CR2 (100%; mediana: 1,20; variação: 0,00% – 3,00%) (Figura 1- C, D). Observou-se discreto maior percentual da imunoposição de CD8 nos CR1 em relação aos CR2, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,569$) (Figura 3 - A).

Com relação à imunoposição de CD8 em linfócitos T da cápsula cística, houve positividade em todos os CR1 e CR2 (CR1=100%; mediana: 37,70; variação: 4,40% – 98,8%; CR2= 100%; mediana: 60,5; variação: 23,6% – 186,6%) (Figura 1- A, B). A análise, mediante o teste não paramétrico de Mann-Whitney, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,247$), porém houve maior imunoposição de CD8 em capsula de CR2 (Figura 3 - B).

Considerando a imunoposição de CD8 em relação ao comportamento clínico das lesões, observou-se que as LPs persistente (CR2 e GP2) apresentavam maior percentual de imunoposição dessa proteína do que as primárias (CR1 e GP1), com diferença estatisticamente significativa entre CR2 e GP2 ($p = 0,014$), destacando-se a expressão em CR2 (Figura 3 – B).

Imunoposição de CD4

Os granulomas periapicais exibiram imunopositividade citoplasmática e membranar para CD4 distribuída de forma predominantemente difusa em linfócitos T de todos os GP1 (100%; mediana: 11,70; variação: 0,00% – 89,80%) e nos 09 GP2 (100%; mediana: 7,70; variação: 0,00% – 140,80%) (Figura 2 – A, B). Observou-se maior percentual de linfócitos T CD4 em GP1, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos dessa lesão ($p = 0,450$) (Figura 3 - B).

Foi observada imunopositividade citoplasmática e membranar para CD4 distribuída de forma predominantemente difusa em linfócitos T intraepiteliais principalmente nas camadas suprabasais, nos 10 casos de CR1 (100%; mediana: 1,20; variação: 0,00% – 7,00%) e nos 10 CR2 (100%; mediana: 1,20; variação: 0,00% – 14,00%) (Figura 2 – C, D), com maior percentual de imunoposição dessa proteína em linfócitos intraepiteliais dos CR2, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 1,000$) (Figura 3 - A).

Com relação à imunoexpressão de CD4 em linfócitos T da cápsula cística, houve positividade em todos os CR1 e CR2 (CR1=100%; mediana: 45,30; variação: 4,00% – 89,80%; CR2= 100%; mediana: 20,10; variação: 4,80% – 46,20%). (Figura 2 – A, B), O teste não paramétrico de Mann-Whitney, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os CR1 e CR2 ($p = 0,226$), porém houve maior percentual de linfócitos T CD4 na capsula de CR2 (Figura 3 - B).

Considerando a imunoexpressão de CD4 em relação ao comportamento clínico das lesões, observou-se que as LPs primárias (CR1 e GP1) apresentavam maior percentual de linfócitos T CD4 do que as persistentes (CR2 e GP2), sem que houvesse diferença estatisticamente significativa ($p = 0,496$; $p = 0,50$) (Figura 3 – B).

Proporção de CD4/CD8

A análise quantitativa das LP2 e LP1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativa para as populações celulares. Na avaliação da proporção de CD4/CD8 no tecido conjuntivo dos GP, observou-se para GP1 (mediana: 0,51; variação: 0,00% – 14,48%; DV: 4,41) e GP2 (mediana: 0,24; variação: 0,00% – 999,0%; DV: 332,7).

No limitante epitelial dos CR foi observado para CR1 (mediana: 0,24; variação: 0,00% – 7,00%; DV: 2,48) e CR2 (mediana: 1,5; variação: 0,00% – 5,38%; DV: 1,71). Na cápsula cística dos CR foi evidenciado para CR1 (mediana: 2,07; variação: 0,15% – 6,91%; DV: 2,07) e CR2 (mediana: 0,44; variação: 0,03% – 1,89%; DV: 0,64).

Imunoexpressão de PD1

Os GP exibiram imunopositividade citoplasmática/membranar e nuclear para PD1 distribuída de forma predominantemente difusa de todos os casos primários e persistentes (Citoplasma: GP1=100%; mediana: 30,71; variação: 12,71% – 76,72%; GP2= 100%; mediana: 4,57; variação: 0,00% – 55,92%; núcleo: GP1= 100%; mediana: 0,15; variação: 0,00% - 2,44%; GP2 = 100%; mediana 0,20; variação: 0,00% -0,33%) (Figura 4 – A, B). Observou-se maior percentual PD1 (citoplasmático/membranar) em GP2, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos dessa lesão ($p = 0,004$) (Figura 6 - A).

Foi observada imunoexpressão de PD1 na cápsula cística, houve positividade em todos os CR1 (citoplasma - mediana: 11,06; variação: 1,12% – 65,67% e núcleo – mediana: 0,00; variação: 0,00% - 0,35%) e CR2 (citoplasma - mediana: 16,10; variação: 0,56% – 49,64% e núcleo – mediana: 0,55; variação: 0,00% - 1,48%). (Figura 4 – C, D), O teste não paramétrico

de Mann-Whitney, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os CR1 e CR2 (citoplasma – $p= 0,821$ / núcleo- $p=0,215$), porém houve maior percentual de PD1 na cápsula de CR2 (Figura 6 - A).

Imunoexpressão de PD-L1

Os GP exibiram imunopositividade citoplasmática/membranar e nuclear para PD-L1 distribuída de forma predominantemente difusa no tecido conjuntivo de todos os casos persistentes e primários (Citoplasma: GP1= 100%; mediana: 61,37; variação: 3,87% – 61,37%; GP2=100%; mediana: 68,66; variação: 9,81% – 86,02%; núcleo: GP1 = 100%; mediana 0,29; variação: 0,00% -1,35%; GP2= 100%; mediana: 0,57; variação: 0,00% - 10,58%) (Figura 5 – A, B). O teste não paramétrico de Mann-Whitney, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os GP2 e GP1 (citoplasma – $p= 0,033$ / núcleo- $p=0,272$) (Figura 7 - B).

Foi observada imunopositividade citoplasmática/membranar e nuclear para PD-L1 distribuída de forma predominantemente difusa no tecido epitelial principalmente nas camadas suprabasais no epitélio cístico, houve positividade em todos os CR1 e CR2 (Citoplasma: CR1= 100%; mediana: 35,08; variação: 2,16% – 82,22%; CR2=100%; mediana: 79,56; variação: 0,00% – 89,21%; núcleo: CR1 = 100%; mediana 0,00; variação: 0,00% -17,58%; CR2= 100%; mediana: 0,79; variação: 0,00% - 38,42%;). (Figura 5 – C, D), O teste não paramétrico de Mann-Whitney, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os CR2 e CR1, tanto para citoplasma quanto núcleo ($p = 0,023$; $p= 0,869$) (Figura 7 - A).

Com relação à imunoexpressão de PD-L1 na cápsula cística, houve positividade em todos os CR1 (citoplasma - mediana: 21,41; variação: 7,06% – 71,021% e núcleo – mediana: 0,00; variação: 0,00% - 2,89%) e CR2 (citoplasma - mediana: 91,59; variação: 83,07% – 94,96% e núcleo – mediana: 7,19; variação: 0,00% - 11,47%) (Figura 5 - C, D). O teste não paramétrico de Mann-Whitney, mostrou diferença estatisticamente significativa entre os CR2 e CR1, na imunomarcção citoplasmática (citoplasma – $p < 0,001$) (Figura 7 - B).

Considerando a imunoexpressão de PD-L1 em relação ao comportamento clínico das lesões, observou-se que as LPs persistentes (CR2 e GP2) apresentavam maior expressão de PD-L1 do que as primárias (CR1 e GP1), com diferença estatisticamente significativa entre CR2 e GP2 (citoplasma $p < 0,001$ e núcleo $p= 0,003$) (Figura 7 - B).

Relação da imunexpressão de CD4+, CD8+, PD1 e PD-L1 aos parâmetros histomorfológicos

Considerando os parâmetros histomorfológicos dos CRs e GPs não foi observada estatisticamente significativa na quantidade de linfócitos T CD8, T CD4, PD1 e PD-L1 em relação ao padrão do revestimento epitelial dos CRs e o grau de intensidade do infiltrado inflamatório dessas lesões e dos GPs (Tabela 3).

Correlação entre as imunexpressões de CD4+, CD8+, PD1 e PD-L1 nas LP2

De acordo com o teste estatístico de Spearman para os marcadores avaliados, foram observadas correlações positivas, estatisticamente significativas, entre as imunexpressões nucleares e membranares/citolasmáticas GP2 (PD-L1 citoplasmático X T CD8 / $R= 0,881$, $p= 0,004$) e CR2 (PD-L1 nuclear em epitélio X T CD4 em epitélio / $R= 0,886$, $p= 0,001$) (Dados não mostrados em tabelas).

Discussão

Diversas técnicas, instrumentais e soluções têm sido empregados para otimizar os resultados dos tratamentos endodônticos, possibilitando procedimentos mais rápidos, menos dolorosos e maior sobrevida dos dentes tratados endodonticamente.⁴ Além disso, o diagnóstico, os mecanismos fisiopatológicos e a intervenção clínico-terapêutica das LP2 ainda são considerados um desafio ao tratamento endodôntico.^{1,3,4} Diante disso, a compreensão dos mecanismos de evasão imune, por meio da via PD1/PD-L1 associada a linfócitos T CD4+ e T CD8+ pode ajudar a compreender a fisiopatologia das lesões persistentes e possibilitar novas alternativas de sucesso para estas lesões.

O processo inflamatório é caracterizado por mecanismos inespecíficos de resposta imunológica, que executam função na defesa e na degradação da matriz extracelular por meio da liberação de citocinas pro e anti-inflamatórias.²⁴ Entretanto, não se pode atribuir função apenas dos componentes imuno-inflamatórios, visto que LPs estão em contato permanentemente com produtos bacterianos presentes no interior do canal radicular, o que serve como principal fonte antigênica para a patogênese dessas lesões.^{1,4} Em LP2, possivelmente infecções com maior potencial de patogenicidade, que persistem à terapia endodôntica inicial ou se organizaram no meio extraradicular¹ estariam contribuindo para perpetuação dos sinais e sintomas.^{2,3} A resposta imunoinflamatória nas LP pode variar a depender da presença de microrganismos e da resposta do hospedeiro.^{2,11,13} Os linfócitos desempenham papel importante

nas respostas inflamatórias crônicas do GP e CR, com destaque para os linfócitos T CD4+ e TCD8+.^{10,11} No presente estudo, observou-se uma maior imunoexpressão de linfócitos T CD4 e T CD8 nas LP2, quando comparadas às LP1. Considerando o comportamento clínico entre as LPs, o fato das LP2 (CR2 e GP2) terem apresentado maiores percentuais de linfócitos T CD8+ do que as LP1, com diferença estatisticamente significativa, pode sugerir que essas células desempenham papel importante na modulação da resposta imune adaptativa celular nas lesões persistentes. Tais achados corroboram os resultados de outros trabalhos^{2,3} que evidenciaram maior expressão de proteínas relacionadas a resposta linfocitária nas LP2, processos de reabsorção óssea e componente inflamatório agudo, atribuindo um perfil tendendo para a agudização nas LP2.

Mudanças na população de células T são encontradas durante o desenvolvimento das LP²⁷ nas LP1 normalmente há aumento substancial de células T CD4+ e CD8+ em molares de ratos,²⁸ contudo é evidenciado maior população de L T CD4+.²⁹ Acredita-se que um dos papéis dos linfócitos T CD4+ é modular a citotoxicidade do microambiente em que os L T CD8+ se encontram, tendo em vista o controle do processo infeccioso e a cronificação da lesão.³⁰

O predomínio nas LP2 da população de L TCD8+ pode indicar um microambiente com maior patogenicidade, uma vez que essas células possuem ação citotóxica, secretando perforinas e granzimas, que induzem a apoptose das células infectadas. Face ao exposto, há inibição da replicação de microrganismos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α IFN),^{30,31} podendo assim, contribuir para a perpetuação do processo inflamatório persistente nessas lesões, no entanto, é importante considerar que LP não são estáticas, sua natureza pode mudar de acordo com os componentes celulares e bioquímicos no microambiente ou do hospedeiro.³²⁻³⁴

A persistência do processo inflamatório em lesões crônicas leva a exaustão e consequentemente supressão das células T, podendo ter envolvimento na modulação das reações inflamatórias nestas lesões.³⁵ Diversos mecanismos têm sido sugeridos em relação a essa modulação, os achados de Brito et al. (2018)³⁶ ao avaliar galectinas-1 e 7, por imunistoquímica sugeriram que as LPs possuem um perfil pró-apoptótico relacionado aos linfócitos T. Por outro lado, um possível mecanismo seria por meio da via PD-1/PD-L1, nesse contexto Belai et al. (2014)³⁷ e Delgado et al. (2019)¹⁴, evidenciaram que LP1 expressam níveis significativos de PD-1 em linfócitos.

Considerando o antes citado, maior expressão estatisticamente significativa de PD1 nas LP2, principalmente GP2, observada na presente pesquisa pode-se sugerir que a expressão de PD-1 levaria ao fim do processo inflamatório no GP após o controle da infecção, seguido de

ênfase nos mecanismos relacionados ao reparo tecidual. Por outro lado, a expressão de PD-1 também poderia estar relacionada com a permanência e ou aumento da patogenicidade no microambiente da lesão, desse modo, o organismo estaria instaurando um processo constante de defesa imunológica no sentido de modular a agressão tecidual.

No tocante à imunoexpressão citoplasmática de PD-L1, a ocorrência de diferença estatisticamente significativa entre CR2 e CR1, com maior expressão nos CR2, pode sugerir que a imunoexpressão dessa proteína seria um indicativo do papel da via PD-1/PD-L1 para redução do microambiente citotóxico nos CR2. Além disso, esse evento poderia ser potencializado por meio da maior imunoexpressão de CD4 para supressão da resposta linfocítica CD8+. Delgado et al. (2019)¹⁴ também evidenciaram que PD-1 e PD-L1 são expressas em níveis mais elevados por linfócitos T CD4 nas LP1. No contexto das moléculas inibidoras, uma variedade de moléculas adicionais, como CD25, CTLA-4, B7-1 e RGM-2, também são reguladas positivamente nas células T e podem contribuir para inibição da função destas células.³⁸⁻⁴⁰

De modo geral, a via PD1/PD-L1 é responsável pelo controle do processo inflamatório em microambientes que expressam antígenos, a fim de evitar uma resposta imune exacerbada com danos ao tecido normal.⁴¹ Os linfócitos T ativados expressam na sua superfície PD-1. Quando uma célula T reconhece os antígenos expressos pelo complexo MHC na célula alvo, são produzidas citocinas inflamatórias, as quais resultam na expressão de PD-L1 no tecido, que se liga e ativa a proteína PD-1 nas células T, induzindo a tolerância imune, fenômeno no qual o sistema imunológico diminui sua capacidade de ativar uma resposta inflamatória.⁴² Nas LP2, possivelmente em decorrência da maior quantidade de microrganismos e patogenicidade do processo infeccioso-inflamatório, haveria ativação exaustiva da via PD1/PD-L1, o que justificaria a necessidade da avaliação do comportamento clínico das LP1 e LP2. Esse fato é corroborado na presente pesquisa devido a maior expressão de PD-L1 nas LP2, com diferença estatisticamente significativa da expressão dessa proteína, tanto no citoplasma quanto no núcleo.

A via PD-1/PD-L1, além de contribuir para a apoptose dos linfócitos, também pode atuar na inativação das funções linfocitárias, promovendo um processo de anergia. Os linfócitos T necessitam de dois sinais para sua proliferação e diferenciação em células efetoras, sendo o primeiro sinal a presença do antígeno pela APC e o segundo é provido por co-estimuladores expressos também nas APCs em resposta aos microrganismos. Recentemente foi evidenciada baixa expressão de caspases 3 e alta expressão de Bax em CR (LP1), sendo apontada como um possível indicativo para baixa expressão de coestimuladores que não estariam induzindo os

linfócitos à apoptose, mas apenas a um estado de anergia.⁴³ Esse mecanismo justificaria a alta expressão linfocitária nas LP2 e conseqüentemente uma supressão da função destas células.

No tocante à PD-L1 é citado que na resistência imune adaptativa, a expressão dessa proteína pode ser induzida em células tumorais e outros tipos de células por interferons e citocinas inflamatórias secretadas por linfócitos T citotóxicos CD8 e/ou ativação da via Th1. Esse cenário poderia promover um contrabalanço do microambiente lesional. Nesse contexto, a ação do complexo PD-1/PD-L1 pode alterar a atividade de múltiplas vias de sinalização levando a supressão das funções das células T, com conseqüente indução da apoptose, anergia ou exaustão dessas células.⁴⁴

Neste estudo, para as LP2, foi observado a correlação positiva da imunoexpressão citoplasmática de PD-L1 com a predominância de T CD8+ em GP2. Face ao exposto, sugere-se que maiores quantidades de linfócitos TCD8+ favoreceriam a predominância de um microambiente citotóxico, possivelmente relacionado com a alta expressão do complexo PD1/PD-L1, propiciando inibição da resposta imune, e conseqüente, persistência da sintomatologia. O achado da correlação da expressão de PD-L1 em epitélio com a presença de L T CD4+ em CR2 leva a inferir que essa correlação estaria servindo como uma barreira moduladora para o controle dos patógenos,³² o que por sua vez ocasionaria uma melhor resposta ao reparo tecidual, quando comparado ao GP2.

As limitações desta pesquisa incluem o tamanho reduzido da amostra, como também a ausência dos dados relacionados a condição sistêmica dos pacientes que poderia interferir na resposta do hospedeiro. Como perspectiva futura, estudos adicionais voltados para avaliação da imunoexpressão do receptor PD1 em epitélio (citoplasma e núcleo) são necessários. Visto a identificação desta marcação no presente trabalho, contudo pela ausência de dados prévios que reforcem esses dados, fica como sugestão de possíveis investigações.

Os achados deste estudo poderiam sustentar o uso de imunoterápicos anti PD-1/PD-L1 como coadjuvantes à terapia endodôntica convencional e ou cirúrgica, promovendo o bloqueio do complexo PD-1/PD-L1, possibilitando uma melhor resposta do organismo frente a aos processos persistentes, pois estaria favorecendo um aumento da resposta imunológica. Face ao exposto, a infiltração de linfócitos T CD8 poderia representar um preditor para utilização desses imunoterápicos para tratamentos de diversas lesões.⁴⁴ O que vai de encontro aos achados desta pesquisa que identificou maior expressão de T CD8 nas lesões persistentes.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesses.

Referências

1. Lopes HP, Siqueira Jr JF. *Endodontia - Biologia e Técnica*. 5th ed. Guanabara Koogan; 2020. 832 p.
2. Estrela C, Decurcio D de A, Silva JA, Batista AC, Lima NC de S, Silva BS de F, et al. Immune-Inflammatory Cell Profile and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand/Osteoprotegerin Expression in Persistent Apical Periodontitis after Root Canal Retreatment Failure. *J Endod*. 2016 Mar;42(3):439–46.
3. Estrela C, Freitas Silva BS, Silva JA, Yamamoto-Silva FP, Pinto-Júnior D dos S, Gomez RS. Stem Cell Marker Expression in Persistent Apical Periodontitis. *J Endod*. 2017;43(1):63–8.
4. Berman L, Hargreaves K, Rotstein I. Cohen - *Caminhos da Polpa*. 12th ed. Guanabara Koogan; 2021.
5. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* [Internet]. 2006 Apr;39(4):249–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x>
6. Love RM, Firth N. Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. *Int Endod J* [Internet]. 2009 Mar;42(3):198–202.
7. ORSTAVIK D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *Int Endod J*. 1996 May;29(3):150–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2591.1996.tb01361.x>
8. Del Fabbro M, Corbella S, Sequeira-Byron P, Tsesis I, Rosen E, Lolato A, et al. Endodontic procedures for retreatment of periapical lesions. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2016 Oct 19;2016(12). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD005511.pub3>
9. Chen J-H, Tseng C-H, Wang W-C, Chen C-Y, Chuang F-H, Chen Y-K. Clinicopathological analysis of 232 radicular cysts of the jawbone in a population of southern Taiwanese patients. *Kaohsiung J Med Sci* [Internet]. 2018 Apr;34(4):249–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.kjms.2018.01.011>
10. Araujo-Pires Ac, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2014 Jul;22(4):336–46. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572014000400336&lng=en&tlng=en
11. Wang L, Yang F, Qiu Y, Ye L, Song D, Huang D. The Potential Roles of T Cells in Periapical Lesions. *J Endod* [Internet]. 2022 Jan;48(1):70–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239921007123>
12. Samuel RO, Ervolino E, de Azevedo Queiroz ÍO, Azuma MM, Ferreira GT, Cintra LTA. Th1/Th2/Th17/Treg Balance in Apical Periodontitis of Normoglycemic and Diabetic Rats. *J Endod* [Internet]. 2019 Aug;45(8):1009–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239919303589>
13. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2020 Jul 16;17(7):387–401. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41569-020-0352-5>
14. Delgado RJR, Pinheiro CR, Gasparoto TH, Sipert CR, Moraes† IG de, Garcia RB, et al. Programmed Death 1 (PD-1) and PD-1 Ligand (PD-L1) Expression in Chronic Apical Periodontitis. *Eur Endod J*. 2019;4(1):3.
15. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer*

- Res [Internet]. 2020;10(3):727–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>
16. Tarantino P, Gandini S, Trapani D, Criscitiello C, Curigliano G. Immunotherapy addition to neoadjuvant chemotherapy for early triple negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2021 Mar;159:103223. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842821000111>
 17. Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F. Anti-PD1/PD-L1 Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Actionable Oncogenic Driver Mutations. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jun 11;22(12):6288. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/12/6288>
 18. Burren S, Reche K, Blank A, Galván JA, Dawson H, Berger MD, et al. RHAMM in liver metastases of stage IV colorectal cancer with mismatch-repair proficient status correlates with tumor budding, cytotoxic T-cells and PD-1/PD-L1. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 2021 Jul;223:153486. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0344033821001473>
 19. Wirta E-V, Szeto S, Hänninen U, Ahtiainen M, Böhm J, Mecklin J-P, et al. Prognostic Value of Immune Environment Analysis in Small Bowel Adenocarcinomas with Verified Mutational Landscape and Predisposing Conditions. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Jul 23;12(8):2018. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/8/2018>
 20. Xiong J, Yang L, Deng Y, Yan S, Gu J, Li B, et al. The causal association between smoking, alcohol consumption and risk of bladder cancer: A univariable and multivariable Mendelian randomization study. *Int J Cancer* [Internet]. 2022 Dec 15;151(12):2136–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.34228>
 21. Qian H, Li H, Xie J, Lu X, Li F, Wang W, et al. Immunity-Related Gene Signature Identifies Subtypes Benefitting From Adjuvant Chemotherapy or Potentially Responding to PD1/PD-L1 Blockage in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Jun 23;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.682261/full>
 22. Junker K, Eckstein M, Fiorentino M, Montironi R. PD1/PD-L1 Axis in Uro-oncology. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2020 Oct 20;21(13):1293–300. Available from: <https://www.eurekaselect.com/180518/article>
 23. Foy J-P, Karabajakian A, Ortiz-Cuaran S, Boussageon M, Michon L, Bouaoud J, et al. Datasets for gene expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma and lung cancer treated or not by PD1/PD-L1 inhibitors. *Data Br* [Internet]. 2022 Oct;44:108556. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352340922007636>
 24. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015 Aug;15(8):486.
 25. Peixoto RF, Pereira J dos S, Nonaka CFW, da Silveira ÉJD, Miguel MC da C. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2012 Sep;57(9):1159–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996912000386>
 26. Moreira PR, Santos DFM, Martins RD, Gomez RS. CD57+ cells in radicular cyst. *Int Endod J* [Internet]. 2000 Mar;33(2):99–102. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2591.2000.00276.x>
 27. Sol M-A, Tkaczuk J, Voigt J-J, Durand M, Sixou M, Maurette A, et al. Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry.

- Oral Microbiol Immunol [Internet]. 1998 Aug;13(4):253–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-302X.1998.tb00704.x>
28. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: A quantitative immunohistochemical study. *J Endod* [Internet]. 1996 Jun;22(6):311–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239996802664>
 29. Stashenko P, Yu SM, Wang C-Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* [Internet]. 1992 Sep;18(9):422–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239906808411>
 30. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine* [Internet]. 2010 Aug;28:C2–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X10010054>
 31. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4 + T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2012;2012:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/925135/>
 32. Weber M, Schlittenbauer T, Moebius P, Büttner-Herold M, Ries J, Preidl R, et al. Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. *Clin Oral Investig*. 2018;22(1):385–94.
 33. França GM, Medeiros CKS, Almeida DRMF, Pinheiro JC, de Andrade ALDL, Santos PPA, et al. Release of Matrix Metalloproteinases by Macrophages in Radicular Cysts and Residual Radicular Cysts. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2022 Apr;30(4):291–7. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/PAI.0000000000001005>
 34. Neville BW. *Patologia oral e maxilofacial*. 4th ed. Rio de Janeiro: Elsevier;
 35. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2007 May 29;56(5):739–45. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00262-006-0272-1>
 36. Prado IM, Paiva SM, Fonseca-Gonçalves A, Maia LC, Tavares-Silva C, Fraiz FC, et al. Knowledge of parents/caregivers about the sleep bruxism of their children from all five Brazilian regions: A multicenter study. *Int J Paediatr Dent*. 2019;29(4):507–23.
 37. Belai EB, de Oliveira CE, Gasparoto TH, Ramos RN, Torres SA, Garlet GP, et al. PD-1 blockage delays murine squamous cell carcinoma development. *Carcinogenesis* [Internet]. 2014 Feb 1;35(2):424–31. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgt305>
 38. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013 Apr 8;13(4):227–42. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3405>
 39. Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010 Apr;22(2):223–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791510000294>
 40. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer* [Internet]. 2021;12(9):2735–46. Available from: <https://www.jcancer.org/v12p2735.htm>
 41. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017 Aug 23;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00561/full>
 42. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2015 Aug 31;14(8):561–

84. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrd4591>
43. Brito LNS. Avaliação imunoistoquímica da via extrínseca da apoptose por meio da galectina-1 em cistos odontogênicos de origem inflamatória e de desenvolvimento [Internet]. UFPE; 2021. Available from: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/46746/1/TESE Livia Natália Sales Brito.pdf>
44. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* [Internet]. 2014 Nov 27;515(7528):568–71. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature13954>

Tabela 1 - Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

<i>Especificidade</i>	<i>Clone</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Incubação</i>
CD4	0.N.52	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Steamer, Citrato, pH 6,0, 60 min, 90°C	Overnight
CD8	SP16	Thermo Scientific.	1:100	Steamer, Citrato, pH 6,0, 60 min, 90°C	Overnight
PD-1	MAA751Hu21	Cloud-clone	1:200	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
PD-L1	MAA788Hu22	Cloud-clone	1:3000	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60	Overnight

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Tabela 2 - Distribuição absoluta e relativa dos casos de lesões periapicais persistentes e primárias de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.

	Parâmetros Clinicopatológicos			
	CR2 (n=10)	CR1 (n=10)	GP2 (n=9)	GP1 (n=10)
Idade do paciente (média em anos)				
Média	29,90	36,10	47,8	46,10
Variação	15-60	13-75	29-62	16-76
Média +/- Desvio Padrão	12,00	19,59	11,39	20,56
Tempo de retratamento endodôntico (média em meses)				
Média	36,80	-	27,33	-
Variação	6-132	-	6-60	-
Média +/- Desvio Padrão	47,59	-	15,62	-
Sexo do Paciente				
Feminino	8 (80,0%)	8 (80,0%)	4 (44,4%)	3 (30,0%)
Masculino	2 (20,0%)	2 (20,0%)	5 (55,6%)	7 (70,0%)
Localização da Lesão				
Maxila	10 (100,0%)	5 (50,0%)	8 (88,9%)	2 (20,0%)
Mandíbula	0 (0,0%)	5 (50,0%)	1 (11,1%)	8 (80,0%)
Intensidade do infiltrado inflamatório				
Grau I	2 (20,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Grau II	2 (20,0%)	2 (20,0%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)
Grau III	6 (60,0%)	7 (70,0%)	7 (77,8%)	10 (100,0%)
Padrão do revestimento epitelial				
Atrófico	5 (50,0%)	3 (30,0%)	-	-
Hiperplásico	5 (50,0%)	7 (70,0%)	-	-

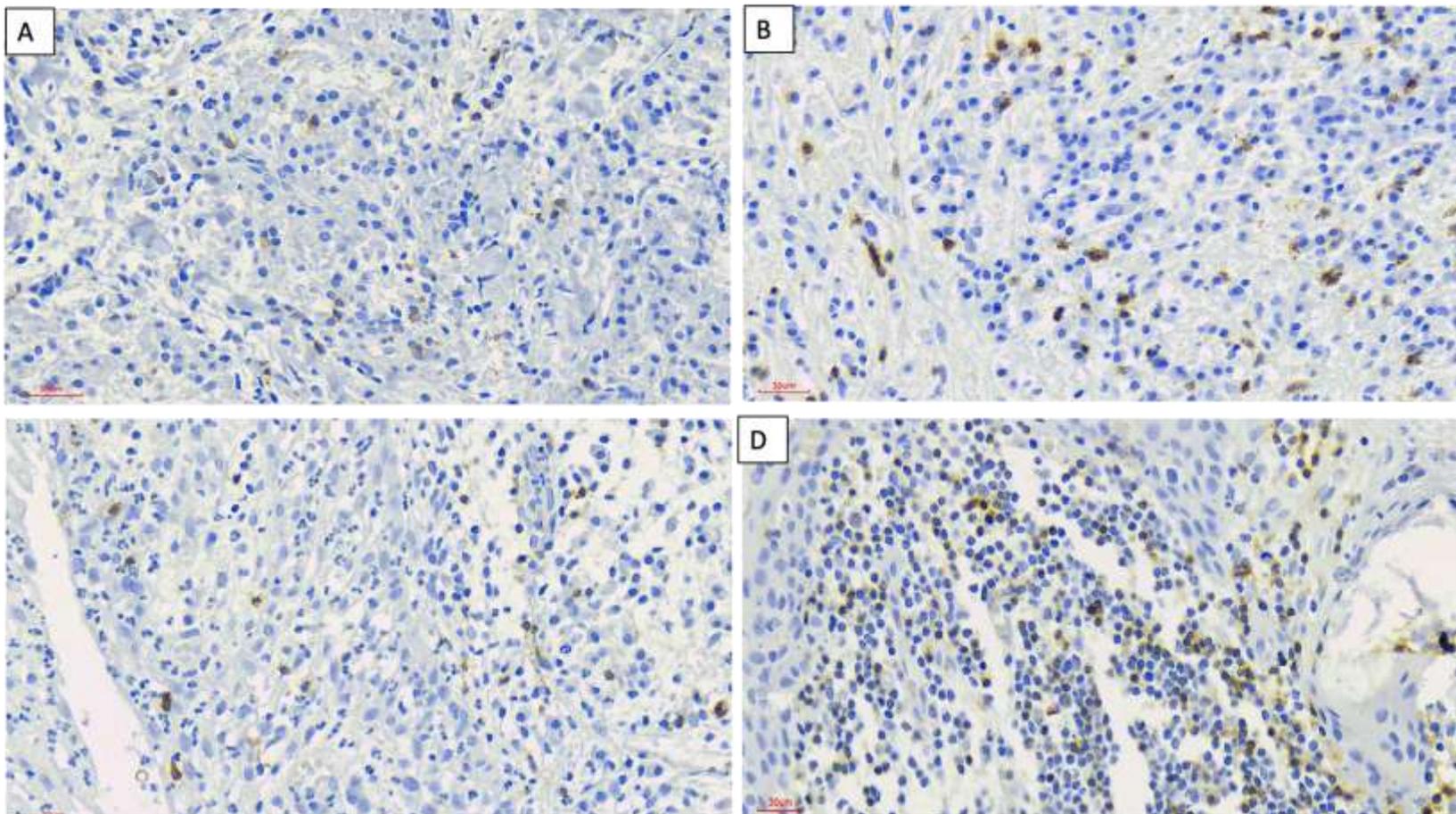
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Tabela 3 - Tamanho da amostra, mediana, mínimo e máximo dos percentuais e significância estatística (*p*) para imunexpressão de T CD4, T CD8, PD1 e PD-L1 no revestimento epitelial (padrão do epitélio) dos CRs e no tecido conjuntivo dos CRs e GPs de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório, nas LPs persistentes e primárias.

Localização/Variáveis	n	T CD8		T CD4		PD1				PD-L1			
		Mediana (Variação)	P	Mediana (Variação)	P	Citoplasma		Núcleo		Citoplasma		Núcleo	
						Mediana (Variação)	P	Mediana (Variação)	P	Mediana (Variação)	P	Mediana (Variação)	P
Padrão de Revestimento Epitelial													
Atrófico	8	1,50 (0,20-2,60)	0,571	1,00 (0,00-14,00)	0,734	12,13 (0,61-40,78)	0,624	0,04 (0,00-1,21)	0,851	62,99 (11,46-89,21)	0,343	1,13 (0,00-11,16)	0,792
Hiperplásico	12	1,20 (0,00-5,20)		1,30 (0,00-7,00)		15,31 (0,00-80,51)		0,00 (0,00-13,29)		46,98 (0,00-84,17)		0,00 (0,00-38,42)	
Infiltrado Inflamatório													
Grau I/II	9	61,0 (0,00-89,00)	0,093	19,20 (0,00-89,92)	0,946	11,53 (0,59-49,64)	0,636	0,00 (0,00-0,53)	0,293	82,05 (7,06-92,89)	0,636	0,77 (0,00-11,47)	0,636
Grau III	29	36,20 (4,40-186,60)		14,80 (0,00-140)		15,12 (0,00-76,72)		0,06 (0,00-2,44)		68,22 (3,82-94,96)		0,46 (0,00-10,58)	

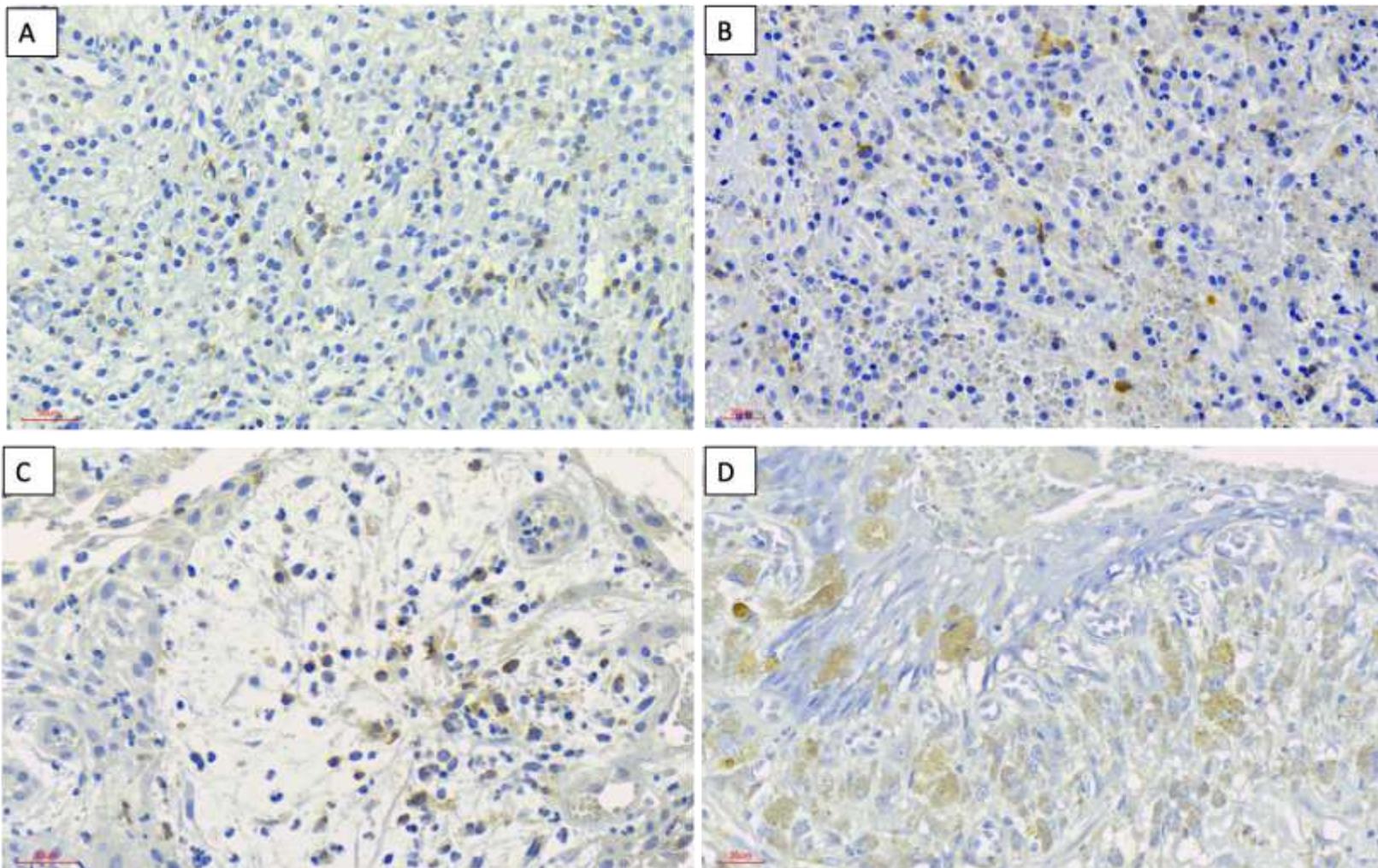
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 1 - Imunoexpressão de CD8 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×)



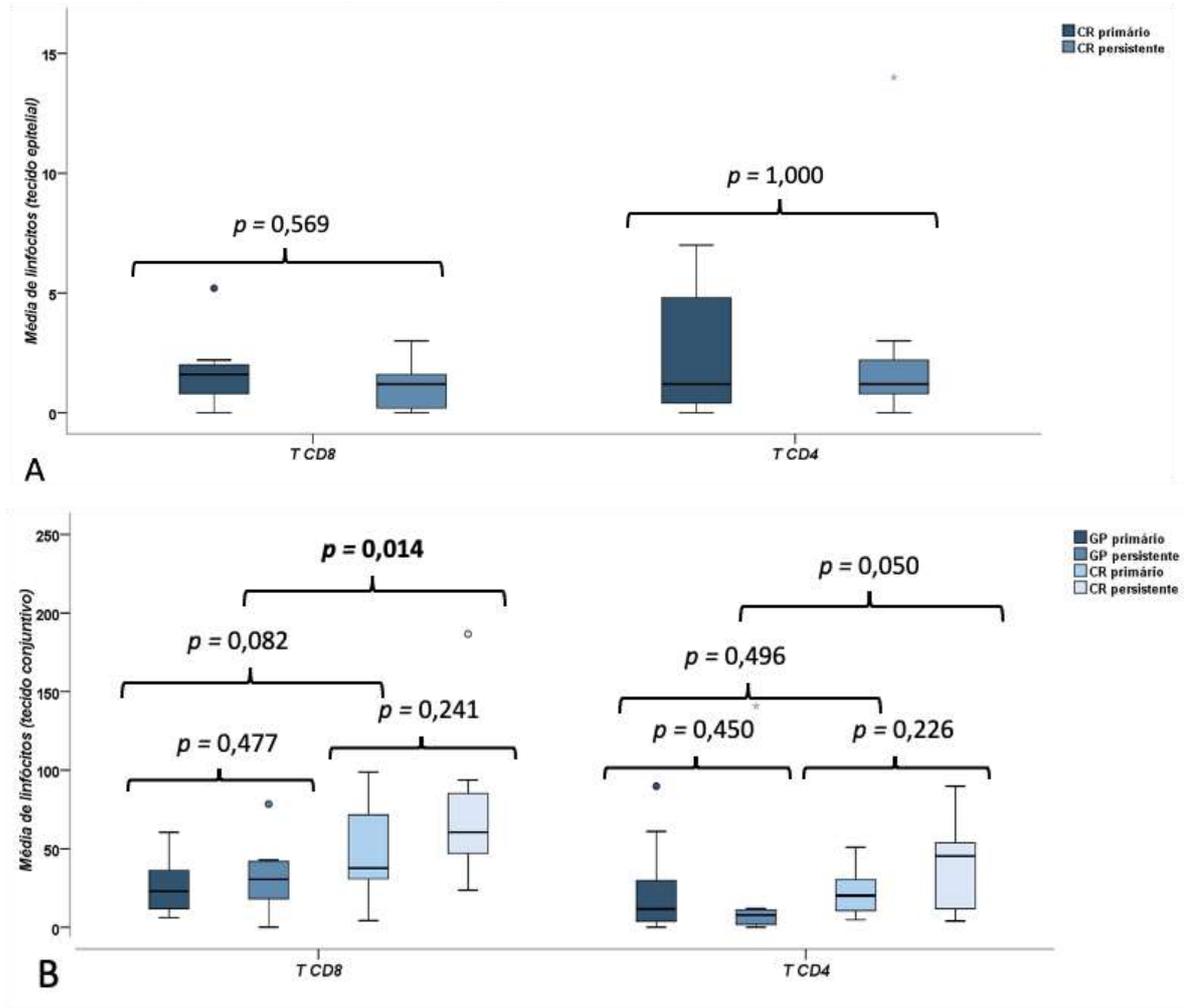
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 2 - Imunoexpressão de CD4 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×).



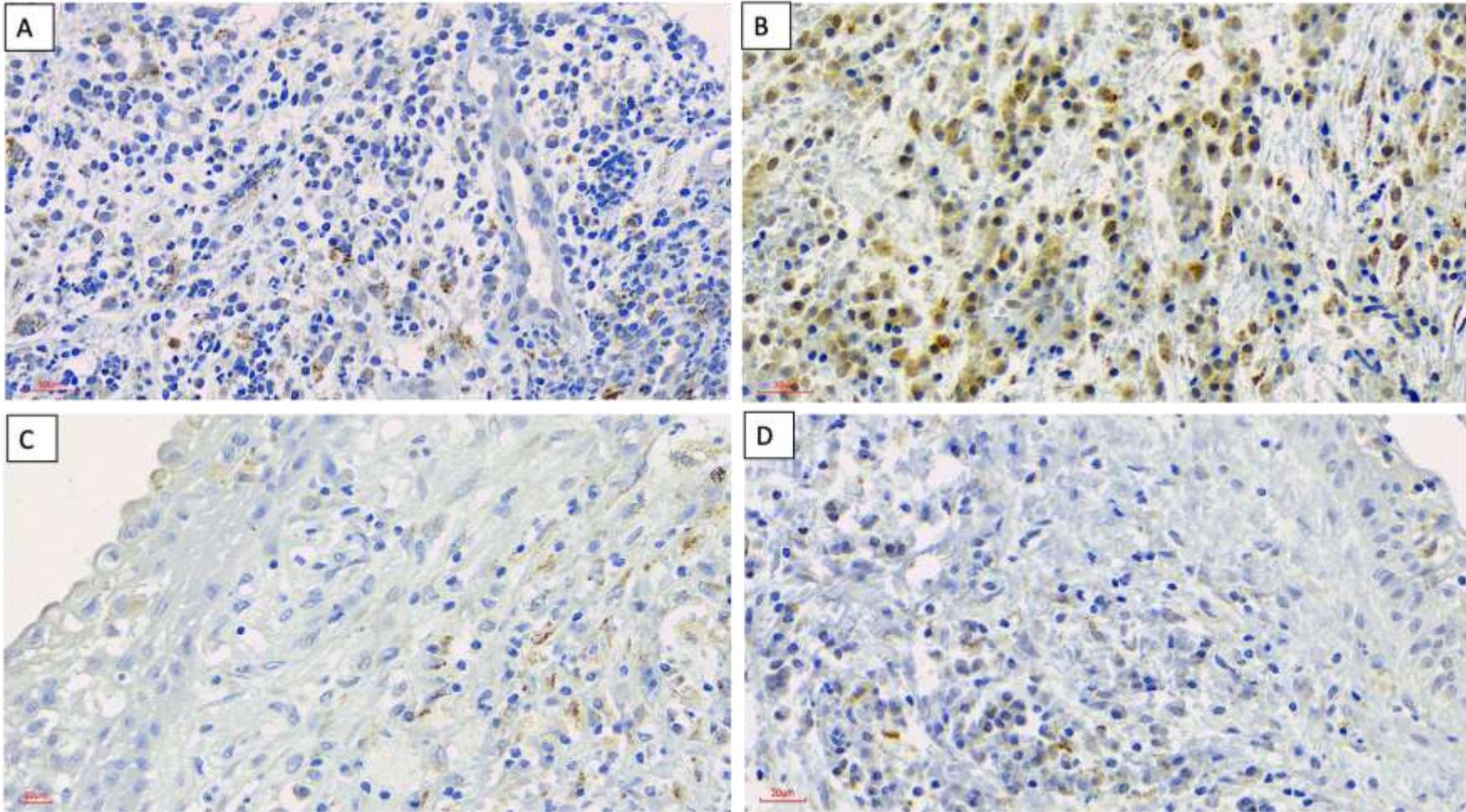
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 3 - BoxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti- T CD8, anti- T CD4, no revestimento epitelial (A) dos CRs e no infiltrado inflamatório (B) do tecido conjuntivo nas LPs primárias e persistentes.



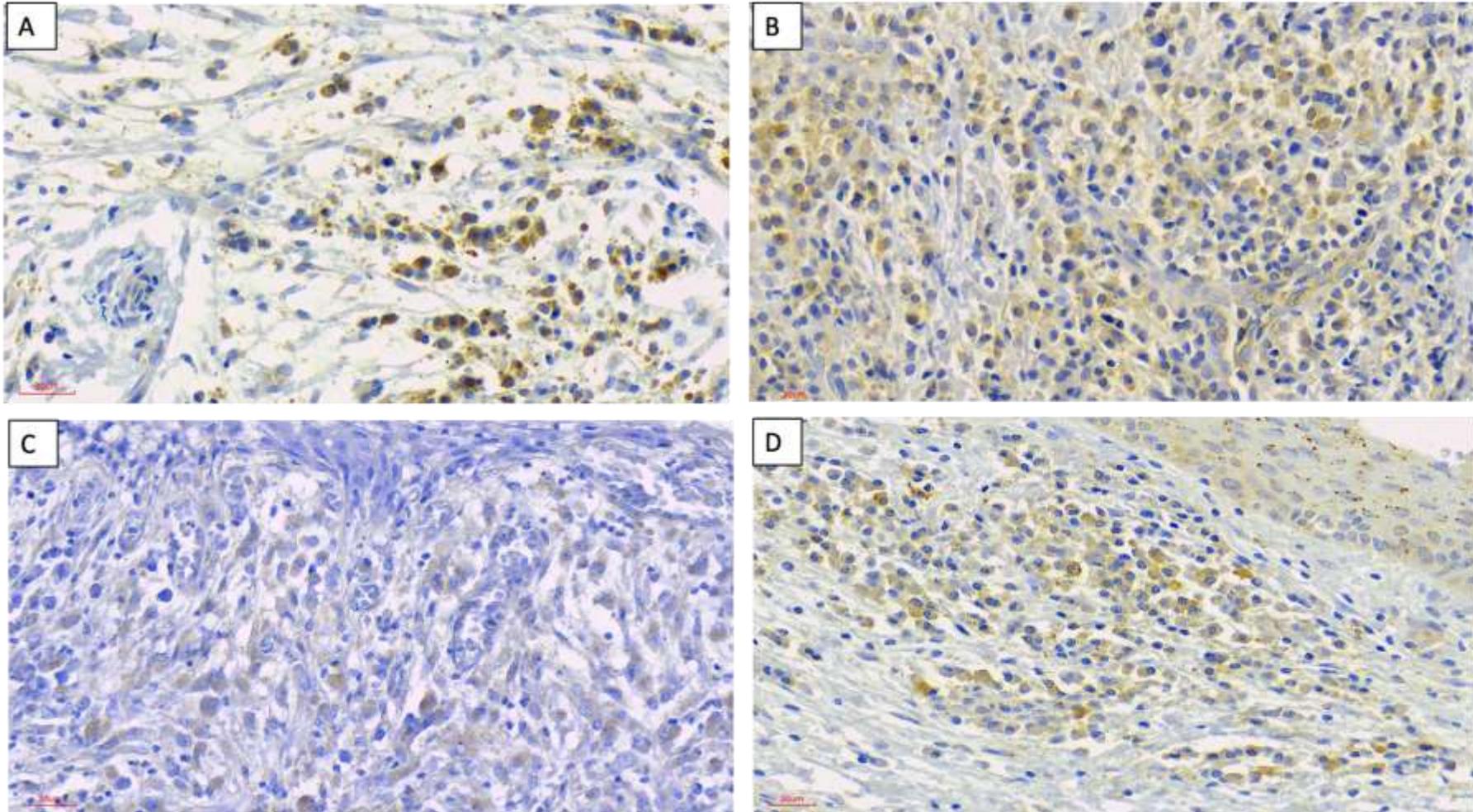
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 4 - Imunoexpressão de PD1 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×).



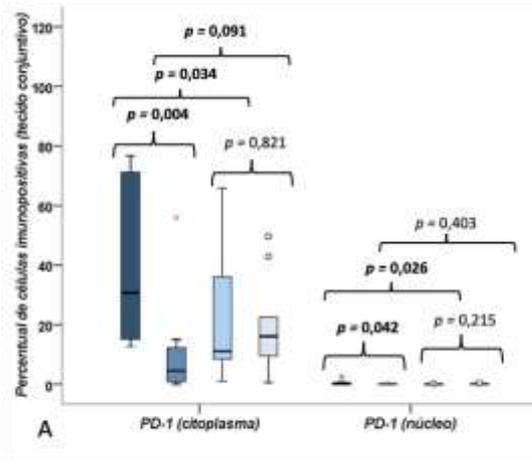
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 5 - Imunoexpressão de PD-L1 em GP1 (A), GP2 (B), CR1 (C) e CR2 (D) (Envision Flex, 200×).



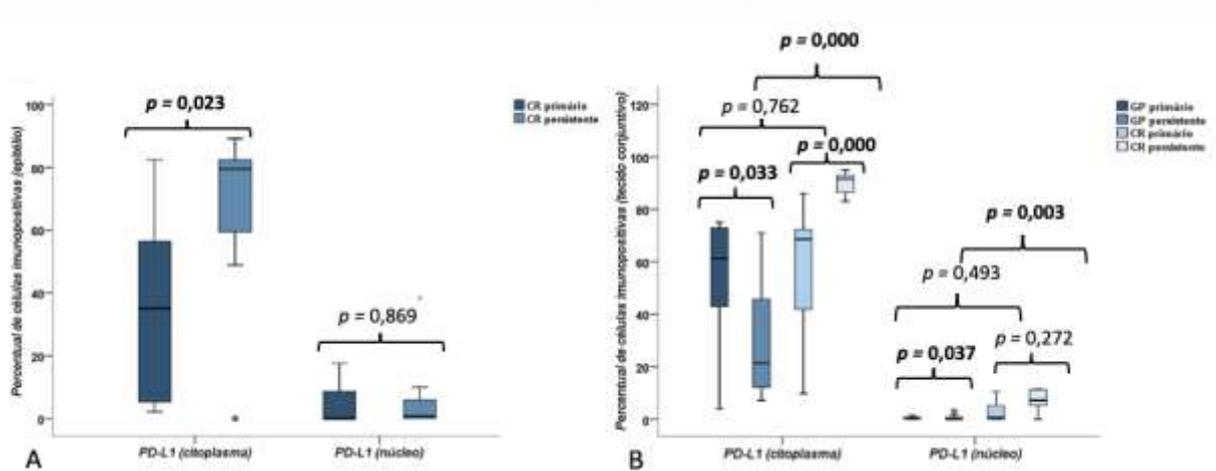
Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 6 - BoxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti-PD-1 (A), no infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo nas LPs persistentes e primárias.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Figura 7 - BoxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti-PD-L1 (citoplasma e núcleo) no revestimento epitelial (A) dos CRs e no infiltrado inflamatório (B) do tecido conjuntivo nas LPs primárias e persistentes.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As LP2 (CR2 e GP2) revelam variações em seus constituintes celulares, e comportamentos clínicos. Na literatura há uma carência de estudos que investigam essas lesões, os mecanismos envolvidos na patogênese dessas lesões persistentes ainda não são completamente compreendidos.

Os resultados deste estudo sugerem um potencial microambiente citotóxico, com maiores quantidades de T CD8 e uma regulação positiva da imunexpressão de PD-1/PD-L1 que tem como função básica a indução dos linfócitos reguladores para o processo de apoptose, diminuindo assim a resposta defensiva do hospedeiro, frente a estas infecções persistentes.

Pesquisas sugerem que as lesões periapicais persistentes possuem diferenças no comportamento imunoinflamatório, possuindo um microambiente pró-inflamatório. No presente estudo, foram encontradas diferenças estatísticas nas imunexpressões de proteínas relacionadas a evasão imune (PD-1 e PD-L1) nas LP2, caracterizando uma diminuição na resposta regulatória dos linfócitos frente as estas lesões.

Assim, os resultados aqui obtidos destacam a importância de novas investigações sobre o tema, que possam contribuir para a melhor compreensão do comportamento biológico das LP2 e para a elaboração de novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, Andrew. Resposta Imune mediadas por Células. *In*: ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew (org.). **Livro - Imunologia Básica - Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 3. ed., 2009. v. 3, p. 100–101.
- AHMADZADEH, M *et al.* Tumor antigen–specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1537–1544, 2009.
- ALSHWAIMI, E. *et al.* Regulatory T Cells in Mouse Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 9, p. 1229–1233, 2009.
- ÁLVARES, P. R. *et al.* Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha in periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 12, p. 1783-87, 2018.
- AMINOSHARIAE, A. *et al.* Association between Systemic Diseases and Endodontic Outcome: A Systematic Review. **Journal of endodontics**, United States, v. 43, n. 4, p. 514–519, 2017.
- ANDRADE, A. L. *et al.* Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box P3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 8, p. 990-4, 2013.
- ARASANZ, H. *et al.* PD1 signal transduction pathways in T cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 51936, 2017.
- ARAÚJO-PIRES, A.C. *et al.* Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 4, p. 336–346, 2014.
- ARYA, S. *et al.* Healing of Apical Periodontitis after Nonsurgical Treatment in Patients with Type 2 Diabetes. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 10, p. 1623–1627, 2017.
- BANERJEE, S. *et al.* JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. **Drugs**, v. 77, n. 5, p. 521–546, 2017.
- BARBER, D.L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 682–687, 2005.
- BARBOSA, N.G.; SÁ, M C.; PINTO, L.P.; FREITAS, R.A. Immunohistochemical study of macrophages subpopulations associated with squamous cell carcinoma of the tongue, with and without metastasis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 6, p. 415-21, 2015.
- BARBOSA, S.R.M. *et al.* Oral squamous carcinoma cells promote macrophage polarization in an MIF-dependent manner. **QJM**, v. 111, n. 11, p. 769-78, 2018.
- BELAI, E.B. *et al.* PD-1 blockage delays murine squamous cell carcinoma development.

Carcinogenesis, v. 35, n. 2, p. 424–431, 2014.

BERBUDI, A. *et al.* Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. **Current Diabetes Reviews**, v. 16, n. 5, p. 442, 2020.

BERNARDI, L. *et al.* Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 12, p. 1951–1961, 2015.

BLANK, C.; MACKENSEN, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 5, p. 739–745, 2007.

BRACKS, I.V.; ARMADA, L.; GONÇALVES, L. S.; PIRES, F. R. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 1, p. 63-8, 2014.

BRAGAZZI, N.L.; PECHKOVA, E.; NICOLINI, C. Proteomics and proteogenomics approaches for oral diseases. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 95, p. 125–162, 2014.

BRAZ-SILVA, P.H. *et al.* Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. **Acta Odontol Scand**, v. 77, n. 3, p. 173–180, 2018.

BRITO, L. C. N. DE *et al.* T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 4, p. 481–485, 2012.

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, p. 728-733, 2018.

BRITO, L. N. S. **Avaliação imunoistoquímica da via extrínseca da apoptose por meio da galectina-1 em cistos odontogênicos de origem inflamatória e de desenvolvimento.** Tese (Doutorado em Odontologia) – UFPE. Recife, p. 107. 2021.

BURREN, S. *et al.* RHAMM in liver metastases of stage IV colorectal cancer with mismatch-repair proficient status correlates with tumor budding, cytotoxic T-cells and PD-1/PD-L1. **Pathology - Research and Practice**, v. 223, p. 153486, 2021.

CAI, J. *et al.* Oral squamous cell carcinoma-derived exosomes promote M2 subtype macrophage polarization mediated by exosome-enclosed miR-29a-3p. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 316, n. 5, C731-C740, 2019.

CHEN, E.; BAKR, M.M.; FIRTH, N.; LOVE, R.M. Inflammatory cell expression of toll-like receptor-2 (TLR2) within refractory periapical granuloma. **F1000Research**, v. 7, p. 1-21, 2018.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, 2013.

CINTRA, L.T.A. *et al.* Evolution of endodontic medicine: a critical narrative review of the

- interrelationship between endodontics and systemic pathological conditions. **Odontology**, v. 109, n. 4, p. 741–769, 2021.
- COLIC, M. *et al.* Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 9, p. 690-6, 2010.
- COLIC, M. *et al.* Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Molecular immunology**, v. 47, n. 1, p. 101–113, 2009.
- COLIC, M. *et al.* Regulatory T-cells in Periapical Lesions. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p. 997–1002, 2009.
- D'SOUZA, M.P.; HARDEN, V.A. Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. **Nature medicine**, v. 2, n. 12, p. 1293–1300, 1996.
- DANTOING, E. *et al.* Anti-PD1/PD-L1 Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Actionable Oncogenic Driver Mutations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6288, 2021.
- DE ALMEIDA, N.F.; BRASIL, S.C.; FERREIRA, D.C.; ARMADA, L. Aging effects in the expression of macrophages in post-treatment apical periodontitis lesions. **Special Care in Dentistry**, v. 37, n. 5, p. 230-5, 2017.
- 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.
- DEL FABBRO, M. *et al.* Endodontic procedures for retreatment of periapical lesions. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 10, p. 1-108, 2016.
- DELGADO, Ronan Jacques Rezende *et al.* Programmed Death 1 (PD-1) and PD-1 Ligand (PD-L1) Expression in Chronic Apical Periodontitis. **European Endodontic Journal**, v. 4, n. 1, p. 3, 2019.
- DESSAUNE NETO, N. *et al.* Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, p. e20170455, 2018.
- DUBEY, C.; CROFT, M.; SWAIN, S. L. Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 8, p. 3280–9, 1996.
- EASLICK, K.A. An evaluation of the effect of dental foci of infection on health. **Journal of the American Dental Association**, v. 42, n. 6, p. 615–697, 1951.
- ESSA, A.A.; DERAZ, E.M. Differential expression of macrophage antigens in periapical lesions: a potential role for macrophage polarization. **Tanta Dental Journal**, v. 15, p. 262-5, 2018.

ESTRELA, C. *et al.* Immune-Inflammatory Cell Profile and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand/Osteoprotegerin Expression in Persistent Apical Periodontitis after Root Canal Retreatment Failure. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 3, p. 439–446, 2016.

ESTRELA, C. *et al.* Stem cell marker expression in persistent apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 1, p. 63-8, 2017.

FIGUEIRA, E. A. *et al.* Inhibitory Signals Mediated by Programmed Death-1 Are Involved With T-Cell Function in Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 11, p. 1833–1844, 2009.

FOY, J.P. *et al.* Datasets for gene expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma and lung cancer treated or not by PD1/PD-L1 inhibitors. **Data in Brief**, v. 44, p. 108556, 2022.

FRAGA, C.A. C. *et al.* Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 4, p. 453-5, 2013.

FRANÇA, G.M. *et al.* Macrophages subpopulations in chronic periapical lesions according to clinical and morphological aspects. **Brazilian Oral Research**, v. 33, p. e47, 2019.

GHEBEH, H. *et al.* The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte-Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 190–198, 2006.

HAN, Y.; LIU, D.; LI, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 3, p. 727–742, 2020.

HARB, J.; LIN, P.J.; HAO, J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. **Current Oncology Reports**, v. 21, n. 2, p. 12, 2019.

HARING, J.S.; BADOVINAC, V.P.; HARTY, J.T. Inflaming the CD8+ T cell response. **Immunity**, United States, v. 25, n. 1, p. 19–29, 2006.

HARRIS, M.; TOLLER, P. THE PATHOGENESIS OF DENTAL CYSTS. **British Medical Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 159–163, 1975.

HEIJMANS-ANTONISSEN, C. *et al.* Multiplex Bead Array Assay for Detection of 25 Soluble Cytokines in Blister Fluid of Patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. **Mediators of Inflammation**, v. 2006, n. 1, p. 1–8, 2006.

HOSGOR, H. *et al.* Evaluation of biopsies of oral and maxillofacial lesions: a retrospective study. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 45, n. 6, p. 316, 2019.

HUNTER, W.. Oral Sepsis as a Cause of Disease. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2065, p. 215, 1900.

IHAN HREN, N.; IHAN, A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 2, p. 156–161, 2009.

- ISHIDA, Y. *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–3895, 1992.
- ITO, T. *et al.* M2 macrophages participate in the biological tissue healing reaction to mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 3, p. 379-83, 2014.
- IWAI, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12293–12297, 2002.
- JAKOVLJEVIC, A. *et al.* Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. **Australian Endodontic Journal**, v. 41, n. 2, p. 72–77, 2015.
- JUNKER, K. *et al.* PD1/PD-L1 Axis in Uro-oncology. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 13, p. 1293–1300, 2020.
- KANAGASINGAM, S. *et al.* Diagnostic accuracy of periapical radiography and cone beam computed tomography in detecting apical periodontitis using histopathological findings as a reference standard. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 5, p. 417–426, 2017.
- KAWASHIMA, N. *et al.* Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: A quantitative immunohistochemical study. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 6, p. 311–316, 1996.
- KIM, P. S.; AHMED, R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 223–230, 2010.
- KIRCHHOFF, A.L.; VIAPIANA, R.; RIBEIRO, R.G. Repercussões periapicais em dentes com necrose pulpar. **RGO.Revista Gaúcha de Odontologia**, 2013.
- KOIVISTO, T.; BOWLES, W.R.; ROHRER, M. Frequency and Distribution of Radiolucent Jaw Lesions: A Retrospective Analysis of 9,723 Cases. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 6, p. 729–732, 2012.
- KONIJINENBURG, D.P.H.V; MUCIDA A. Intraepithelial lymphocytes. **Quick Guide**, v. 25, n. 15, 737-739, 2017
- KUMAR, A. T. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophage content in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 656, 2019.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- LEDESMA-MONTES, C. *et al.* Importance of mast cells in human periapical inflammatory lesions. **Journal of endodontics**, v. 30, n. 12, p. 855–859, 2004.

- LI, C. *et al.* Deficiency suppresses PD-1 expression in CD 8⁺ cytotoxic T lymphocytes for enhanced anti-tumor immunotherapy. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, n. 6, p. 754–769, 2015.
- LIANG, Z. Z.; LI, J.; HUANG, S. G. Transforming growth factor beta-1 expression in macrophages of human chronic periapical diseases. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2017.
- 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.
- LIM, W. *et al.* Curcumin Suppresses Proliferation and Migration and Induces Apoptosis on Human Placental Choriocarcinoma Cells via ERK1/2 and SAPK/JNK MAPK Signaling Pathways. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 4, p. 83–83, 2016.
- LIMA, S. M. F. *et al.* Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 8, p. 700–709, 2013.
- LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR., J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. Elsevier: Rio de Janeiro, 5ed., 848p, 2019.
- LOVE, R.M.; FIRTH, N. Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 3, p. 198–202, 2009.
- LÚCIO, P. S. *et al.* Tumor-associated macrophages (TAMs): clinical-pathological parameters in squamous cell carcinomas of the lower lip. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. e95, 2016.
- MALASPINA, T.S. *et al.* Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 7, p. 965–974, 2011.
- MARÇAL, J.R.B. *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.
- MERRETT, J. *et al.* Total and specific IgG4 antibody levels in atopic eczema. **Clinical and experimental immunology**, v. 56, n. 3, p. 645–652, 1984.
- MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, v. 28, p. C2–C13, 2010.
- NAIR, P. **Essential endodontology : prevention and treatment of apical periodontitis. In: Pathobiology of apical periodontitis**. Blackwell Munksgaard, . p. 80–134, 2008
- NAIR, P. N. R. Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Causes of Endodontic Failures. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 6, p. 348–381, 2004.

NAIR, P.N.R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 4, p. 249–281, 2006.

NAIR, P.N.R. Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Causes of Endodontic Failures. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 6, p. 348–381, 2016.

NEEL, B.G.; GU, H.; PAO, L. The ‘Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 284–293, 2003.

NGUYEN, N. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 38, n. 7, p. 1074–1084, 2016.

NILSEN, R. *et al.* In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 58, n. 2, p. 160–165, 1984.

NODA, A. *et al.* A bilocular radicular cyst in the mandible with tooth structure components inside. **Case Reports in Dentistry**, p. 1-4, 2019.

OEHLERS, F.A.C. Periapical lesions and residual dental cysts. **British Journal of Oral Surgery**, v. 8, n. 2, p. 103–113, 1970.

OHAEGBULAM, K.C. *et al.* Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 24–33, 2015.

OLIVEIRA RODINI, C. DE; LARA, V. S. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, n. 2, p. 221–227, 1992.

ØRSTAVIK, D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. **International Endodontic Journal**, v. 29, n. 3, p. 150–155, 1996.

PAI, S.I.; ZANDBERG, D.P.; STROME, S.E. The role of antagonists of the PD-1:PD-L1/PD-L2 axis in head and neck cancer treatment. **Oral Oncology**, v. 61, p. 152–158, 2016.

PENG, Q. *et al.* Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer (Review). **Oncology Letters**, 2017.

PERSOON, I.F.; ÖZOK, A.R. Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections. **Current Oral Health Reports** 2017 4:4, v. 4, n. 4, p. 278–285, 2017.

PETERS, E; LAU, M. Histopathologic examination to confirm diagnosis of periapical lesions: a review. **Journal Canadian Dental Association**, v. 69, n. 9, p. 598–600, 2003.

PIMENTA P. *et al.* Clinical differential diagnosis between nonodontogenic and endodontic radiolucent lesions in periapical location: A critical review. **Iranian Endodontic Journal**, v. 16, n. 3, p. 150–157, 2021.

QIAN, H. *et al.* Immunity-Related Gene Signature Identifies Subtypes Benefitting From Adjuvant Chemotherapy or Potentially Responding to PD1/PD-L1 Blockage in Pancreatic Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2021.

RUTERBUSCH, M. *et al.* In Vivo CD4 + T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. **Annual Review of Immunology**, v. 38, n. 1, p. 705–725, 2020.

SALMANINEJAD, A. *et al.* PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. **Immunogenetics**, v. 70, n. 2, p. 73–86, 2018.

SAMUEL, R.O. *et al.* Th1/Th2/Th17/Treg Balance in Apical Periodontitis of Normoglycemic and Diabetic Rats. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 8, p. 1009–1015, 2019.

SAMUEL, R.O. *et al.* Th1/Th2/Th17/Treg Balance in Apical Periodontitis of Normoglycemic and Diabetic Rats. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 8, p. 1009–1015, 2019.

SANMAMED, F.; CHEN, L. Inducible Expression of B7-H1 (PD-L1) and Its Selective Role in Tumor Site Immune Modulation. **The Cancer Journal**, v. 20, n. 4, p. 256–261, 2014.

SHARMA, V.R. *et al.* PI3K/Akt/mTOR Intracellular Pathway and Breast Cancer: Factors, Mechanism and Regulation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 11, p. 1633–1638, 2017.

SHARPE, A.H. *et al.* The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nature Immunology**, v. 8, n. 3, p. 239–245, 2007.

SHARPE, A.H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology** 2017 18:3, v. 18, n. 3, p. 153–167, 2017.

SIQUEIRA JR, José F.; RÔÇAS, Isabela N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 4, p. 267–280, 2007.

SIQUEIRA, J.F.J. *et al.* Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.

SIQUEIRA, J.F.J.; RÔÇAS, I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J Dent Res**, v. 88, n. 11, p. 969–981, 2009.

SOL, M.A. *et al.* Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 13, n. 4, p. 253–258, 1998.

STARON, M.M. *et al.* The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8+ T Cells during Chronic Infection. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 802–814, 2014.

STASHENKO, P.; YU, S. M.; WANG, C.-Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 9, p. 422–426, 1992

STERN, M.H. *et al.* Isolation and Characterization of Inflammatory Cells from the Human Periapical Granuloma. **Journal of Dental Research**, v. 61, n. 12, p. 1408–1412, 1982.

TABASSUM, S.; KHAN, F.R. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. **European Journal of Dentistry**, v. 10, n. 1, p. 144, 2016.

TALPOS-NICULESCU, R.M. *et al.* Conservative Approach in the Management of Large Periapical Cyst-Like Lesions. A Report of Two Cases. **Medicina**, v. 57, n. 5, p. 497, 2021.

TARANTINO, P. *et al.* Immunotherapy addition to neoadjuvant chemotherapy for early triple negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 159, p. 103223, 2021.

TEN CATE, A.R. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 34, n. 6, p. 956–964, 1972.

TIBÚRCIO-MACHADO, C.S. *et al.* The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 5, p. 712–735, 2021.

TRAUTMANN, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. **Nature Medicine**, v. 12, n. 10, p. 1198–1202, 2006.

TUMEH, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 568–571, 2014.

WAKOLBINGER, R.; BECK-MANNAGETTA, J. Long-term results after treatment of extensive odontogenic cysts of the jaws: a review. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 1, p. 15–22, 2015.

WANG, L. *et al.* The Potential Roles of T Cells in Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 48, n. 1, p. 70–79, 2022.

WANG, Y.H. *et al.* A novel subset of CD4+ TH2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 11, p. 2479, 2010.

WEBER, M. *et al.* Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 1, p. 385–94, 2018.

WEBER, M. *et al.* Differences in inflammation and bone resorption between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 10, p. 1200–8, 2019.

WHERRY, E. John; KURACHI, Makoto. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486, 2015.

WIRTA, E.V. *et al.* Prognostic Value of Immune Environment Analysis in Small Bowel Adenocarcinomas with Verified Mutational Landscape and Predisposing Conditions. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2018, 2020.

WU, F. *et al.* Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 3, p. 252–280, 2017.

XIAO, G. *et al.* Activator protein 1 suppresses antitumor T-cell function via the induction of programmed death 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 38, p. 15419–15424, 2012.

XIE, W.R. *et al.* Robust Increase of Cutaneous Sensitivity, Cytokine Production and Sympathetic Sprouting in Rats with Localized Inflammatory Irritation of the Spinal Ganglia. **Neuroscience**, v. 142, n. 3, p. 809, 2006.

XU, Z. *et al.* Molecular and Cellular Characterization of Human CD8 T Suppressor Cells. **Front Immunol**, v. 7, n.549 , p. 1-9, 2016.

YAN, S. *et al.* NKG2A and PD-L1 expression panel predicts clinical benefits from adjuvant chemotherapy and PD-L1 blockade in muscle-invasive bladder cancer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 10, n. 5, p. e004569, 2022.

YOUNGBLOOD, B. *et al.* Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8+ T Cells. **Immunity**, v. 35, n. 3, p. 400–412, 2011.

YUKNA, R.A.; CARR, R.L.; EVANS, G.H. Histologic evaluation of an Nd:YAG laser-assisted new attachment procedure in humans. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, v. 27, n. 6, p. 577–587, 2007.

ZHU, J.; PAUL, W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557–1569, 2008.

ZOU, W.; CHEN, L.. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 467–477, 2008.

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

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE LINFÓCITOS T CD4+ / CD8+ E IMUNOEXPRESSION DE PD-1 E PD-L1 EM LESÕES PERIAPICIAIS PRIMÁRIAS E PERSISTENTES.

Pesquisador: MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66027922.4.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.839.503

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem estruturado, apresentando resumo, revisão de literatura e metodologia exequível. O título e os objetivos apresentam coerência. Todos os itens do projeto obedecem às Resoluções 466/12 e 510/16 do Ministério da Saúde

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a expressão do receptor de morte programada PD-1 e seu ligante PD-L1 em relação a parâmetros clinicohistomorfológicos de lesões periapicais persistentes e primárias, visando maiores informações sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na patogenia de lesões periapicais persistentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos potenciais implicados na participação nesta pesquisa são mínimos. Neste contexto, deve-se considerar a possibilidade de exposição dos dados pessoais dos pacientes. Este risco, no entanto, será minimizado pelo uso de codificações que garantirão a privacidade e confidencialidade dos dados, assegurando que não sejam utilizadas quaisquer indicações que possam identificar os participantes da pesquisa.

Benefícios - os participantes contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese das lesões periapicais persistentes e primárias

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@setor.uepb.edu.br

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



Continuação do Parecer: 5.839.503

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância e segue o que preconizam as Resoluções 466/12 e 510/16 do MS. O texto apresenta-se de fácil entendimento

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos e anexos apresentam-se em consonância com o que se pretende analisar e conforme o solicitado pelo CEP.

Recomendações:

Solicitamos que ao término da pesquisa nos seja encaminhado os resultados da mesma, em forma de relatório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é viável, está embasado cientificamente e conforme preconizam as Resoluções 466/12 e 510/16 do Ministério da Saúde. Portanto emito parecer favorável.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2052079.pdf	08/12/2022 08:37:11		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	08/12/2022 08:36:15	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TCLE.pdf	07/12/2022 21:15:58	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL_PARA_USO_E_COLETA.pdf	07/12/2022 21:15:14	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	07/12/2022 21:13:48	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO_COMPROMISSO_PARA_UTILIZACAO_DE_DADOS_DE_ARQUIVO_OU_PRONTUARIOS.pdf	07/12/2022 21:11:44	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	07/12/2022 21:06:56	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito

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@setor.uepb.edu.br

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



Continuação do Parecer: 5.839.503

Declaração de concordância	DECLARACAO_CONCORDANCIA_CO M_PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	07/12/2022 21:06:36	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL.pdf	07/12/2022 21:05:33	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	07/12/2022 21:02:14	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	GORDONNUNEZ_TCD4_CD8_PD_1_PD_L1_PERIAPICOPATIAS.pdf	06/12/2022 23:47:34	MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 27 de Dezembro de 2022

Assinado por:

Gabriela Maria Cavalcanti Costa
(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@setor.uepb.edu.br

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

Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The *JOE* publishes original and reviews articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students, and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

General Points on Composition

Organization of Original Research Manuscripts

Manuscripts Category Classifications and Requirements

Available Resources

General Points on Composition

1. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:
2. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
3. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983).” In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

4. Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.
5. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)
6. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.
7. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”
8. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.
9. Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

Organization of Original Research Manuscripts

Please Note: *All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.*

1. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (*e.g.*, use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to

published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and order reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.

2. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings, and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (*e.g.*, PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.
3. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing the extensive review of the literature, and discuss the results of the study in this section.
4. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components of this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (*e.g.*, antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an *in vitro* model to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the **model**, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the

effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

5. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts, and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. The author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (*e.g.*, microarray data).
6. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photos, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two column-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (*e.g.*, “A,” “B,” etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (*J Endod* 2012;38:884–888); Olivieri et al., (*J Endod* 2012;38:1007–1011); Tsai et al (*J Endod* 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multi-panel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for the maximum number of allowable figures). The second type of figures is graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y-axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.
7. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary: Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

8. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical leadership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions
9. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise, the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed
10. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the JOE. The JOE uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits to the number of references for review articles.

Manuscripts Category Classifications and Requirements

Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:

1. **CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts** in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at consort-statement.org. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

2. Review Article-Manuscripts in this category is either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even when followed by the extensive review of the literature will be categorized as “Case Report/Clinical Technique”. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
3. Clinical Research (*e.g.*, prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
4. Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.
5. Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables*.
6. Case Report/Clinical Technique (*e.g.*, report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*.* Figures, if submitted as multi-panel figures must not exceed 1-page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require the approval of the JOE Editor or associate editors. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at jendodontics@uthscsa.edu. Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.

Available Resources

Strunk W, White EB. *The Elements of Style*. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X.
 Day R. *How to Write and Publish a Scientific Paper*. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9.
 Woods G. *English Grammar for Dummies*. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review

of grammar).
Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.
Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.