



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PATRÍCIA MARIA DE RIBEIRO VIEIRA

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS GALECTINA-1 E BCL-2
EM CISTOS RADICULARES**

Recife

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PATRÍCIA MARIA DE RIBEIRO VIEIRA

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS GALECTINA-1 E BCL-2
EM CISTOS RADICULARES**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Coorientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

Recife

2021

PATRÍCIA MARIA DE RIBEIRO VIEIRA

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS GALECTINA-1 E BCL-2
EM CISTOS RADICULARES**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada.

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Elaine de Amorim Carvalho (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Ericka Janine Dantas da Silveira (Examinador Externo)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^a Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel (Examinador Externo)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dedico este estudo a todos os professores que acreditam na construção de uma sociedade mais reflexiva, igualitária e transformadora a partir da educação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Eunice Ribeiro Vieira e Zúlio Vieira da Silva** (*in memoriam*), pelos ensinamentos e exemplos de integridade que diariamente alicerçam minha vida. Ao meu irmão, **Sérgio Murilo de Ribeiro Vieira**, pelo apoio desde que iniciei minha jornada profissional em Recife. Eu amo vocês, família!

À **Gabriela Ferraz Sitonio de Assis**, minha melhor companhia, minha calma, meu abrigo. Meu melhor encontro!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy**. Sua dedicação e afeto na missão de doar conhecimentos entusiasma, e o privilégio de estar ao seu lado nessa nova jornada me fortalece. Minha gratidão ao meu irmão do coração. Meu melhor amigo!

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, pela atenção e disponibilidade para condução desse projeto. Meu muito obrigada!

À **Guiomar Carvalho**, essencial na minha jornada de autoconhecimento. Minha gratidão!

À **Lívia Brito**, pelo apoio e trabalho ativo neste projeto. Meu muito obrigada!

À **Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira**, obrigada pela seleção dos casos que integraram a amostra da pesquisa.

Às **Profas. Dras. Diana Albuquerque, Ericka Silveira e Roberta Cavalcante** e ao **Prof. Glauco Ferreira**, minha gratidão pela doação de casos incluídos na amostra da pesquisa.

Às **Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Estadual de Pernambuco (UEPB) e Universidade de Fortaleza (UNIFOR)**, pela parceria e contribuição durante a execução desse trabalho.

À **Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**, pela constante construção de conhecimentos e competências. Meu orgulho!

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)** pelos apoios financeiros concedidos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste estudo. Muito obrigada!

RESUMO

Embora a patogênese dos cistos radiculares (CRs) já esteja estabelecida, a função inflamatória em manter e estimular o crescimento destas lesões ainda precisa ser melhor esclarecido. A presente pesquisa avaliou a compreensão da resposta inflamatória através da expressão imunoistoquímica da galectina-1 (gal-1) e Bcl-2 em 19 CRs refratários a tratamento endodôntico e em 19 CRs presentes em dentes não submetidos a tratamento endodôntico, correlacionando-a com os parâmetros histopatológicos de intensidade de infiltrado inflamatório e padrão de revestimento epitelial. Os espécimes foram submetidos à marcação pelo método imunoistoquímico, utilizando os anticorpos anti-gal-1 e anti-Bcl-2. A análise quantitativa foi realizada pela contagem de células inflamatórias, examinando a localização citoplasmática e/ou nuclear para proteína ga-1, e para Bcl-2 a localização citoplasmática, mediante o estudo de 5 campos microscópicos com maior imunorreatividade para cada componente avaliado. A análise morfológica do revestimento epitelial revelou distribuição semelhante para os dois grupos de CRs, com prevalência do padrão de epitélio hiperplásico. Os CRs não submetidos à tratamento endodôntico exibiram, em sua maioria, o infiltrado inflamatório Grau III e os CRs refratários ao tratamento endodôntico, o infiltrado inflamatório Grau I/II. A análise dos percentuais de imunopositividade citoplasmática para gal-1 revelou expressão significativa nos CRs sem tratamento endodôntico em relação aos CRs refratários ao tratamento. Referindo-se aos aspectos histopatológicos dos CRs, foi vista diferença estatisticamente significativa apenas para os percentuais de imunopositividade nuclear de gal-1 no revestimento epitelial das lesões. A imunopositividade de Bcl-2 foi apresentada em todos os casos de CRs, tanto no revestimento epitelial quanto na cápsula fibrosa. No tocante às características histopatológicas dos CRs, foi identificada diferença estatisticamente significativa apenas para os percentuais de imunopositividade de Bcl-2 na cápsula fibrosa de CRs com revestimento epitelial hiperplásico em relação aos CRs com revestimento atrófico. Apenas o grupo dos CRs refratários ao tratamento endodôntico exibiu correlação positiva entre as imunopositividades citoplasmática e nuclear de gal-1 no revestimento epitelial. Não foi vista correlação para as imunopositividades de gal-1 e Bcl-2 nos compartimentos teciduais (epitelial e conjuntivo) e celulares (citoplasma/núcleo) dos grupos de CRs estudados. A presença de gal-1 nos compartimentos teciduais (epitelial e conjuntivo) e celulares (citoplasma/núcleo) dos grupos de CRs estudados pode indicar sua atuação na mitigação das respostas inflamatórias não resolvidas, sugerindo a necessidade de mais estudos para a compreensão do seu papel no comportamento biológico dessas lesões. A maior imunopositividade de Bcl-2 na cápsula fibrosa dos CRs com padrão de revestimento

epitelial hiperplásico parece estar relacionada à manutenção de estímulo antigênico e consequente proliferação celular.

Palavras-chave: cisto radicular; galectinas; apoptose; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Although the pathogenesis of radicular cysts (RCs) is already established, the inflammatory function in maintaining and stimulating the growth of these lesions still needs to be better clarified. The present research evaluated the understanding of the inflammatory response through the immunohistochemical expression of galectin-1 (gal-1) and Bcl-2 in 19 RCs refractory to endodontic treatment and in 19 RCs present in teeth not submitted to endodontic treatment, correlating it with histopathological parameters of inflammatory infiltrate intensity and pattern of epithelial lining. The specimens were subjected to staining using the immunohistochemical method, using anti-gal-1 and anti-Bcl-2 antibodies. Quantitative analysis was performed by counting inflammatory cells, examining the cytoplasmic and / or nuclear location for protein ga-1, and for Bcl-2 the cytoplasmic location, by studying 5 microscopic fields with greater immunoreactivity for each component evaluated. The morphological analysis of the epithelial lining revealed a similar distribution for the two groups of RCs, with prevalence of the hyperplastic epithelium pattern. RCs not submitted to endodontic treatment exhibited, in their majority, Grade III inflammatory infiltrate and RCs refractory to endodontic treatment, Grade I / II inflammatory infiltrate. The analysis of the percentages of cytoplasmic immunopositivity for gal-1 revealed significant expression in RCs without endodontic treatment in relation to RCs refractory to treatment. Referring to the histopathological aspects of the RCs, a statistically significant difference was seen only for the percentages of nuclear gal-1 immunoexpression in the epithelial lining of the lesions. Bcl-2 immunoexpression has been shown in all cases of RCs, both in the epithelial lining and in the fibrous capsule. Regarding the histopathological characteristics of the RCs, a statistically significant difference was identified only for the percentage of Bcl-2 immunoexpression in the fibrous capsule of RCs with hyperplastic epithelial lining in relation to the RCs with atrophic lining. Only the group of RCs refractory to endodontic treatment showed a positive correlation between cytoplasmic and nuclear immunoexpressions of gal-1 in the epithelial lining. No correlation was found for the immunoexpressions of gal-1 and Bcl-2 in the tissue (epithelial and conjunctive) and cellular (cytoplasm / nucleus) compartments of the studied RC groups. The presence of gal-1 in the tissue (epithelial and conjunctive) and cellular (cytoplasm / nucleus) compartments of the studied RC groups may indicate its role in mitigating unresolved inflammatory responses, suggesting the need for further studies to understand their role in the biological behavior of these lesions. The greater immunoexpression of Bcl-2 in the fibrous capsule of the RCs with a

pattern of hyperplastic epithelial lining seems to be related to the maintenance of antigenic stimulus and consequent cell proliferation.

Keywords: radicular cysts; galectins; apoptosis; immunohistochemical

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografias da imunexpressão de galectina-1 em CRs não submetidos à tratamento endodôntico. (A) e (B) Células do revestimento epitelial hiperplásico exibindo expressão citoplasmática/membranar e nuclear (x400). (C) e (D) Infiltrado inflamatório intenso evidenciando expressão citoplasmática e nuclear em células inflamatórias da cápsula fibrosa. 32
- Figura 2 - Fotomicrografias da imunexpressão de galectina-1 em CRs refratários ao tratamento endodôntico. (A) e (B) Cápsula fibrosa evidenciando infiltrado inflamatório Grau III e expressão nuclear em células inflamatórias (x200). (C) e (D) Células inflamatórias próximas ao revestimento epitelial hiperplásico exibindo expressão nuclear (x400). 33
- Figura 3 - Fotomicrografias da imunexpressão de Bcl-2 em CRs com revestimento hiperplásico. (A) e (B) Alta expressão citoplasmática no infiltrado inflamatório da cápsula fibrosa (x400). (C) e (D) Expressão citoplasmática em células do revestimento epitelial (x400). 35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Variáveis dependentes do estudo.	25
Quadro 2 - Variáveis independentes do estudo.	26
Quadro 3 - Especificidade, Clone, Fabricante, Diluição, Recuperação Antigênica e Incubação dos anticorpos.	26

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição dos casos de CRs sem tratamento endodôntico e refratários ao tratamento endodôntico de acordo com as características clinicopatológicas. 31
- Tabela 2 - Tamanho da amostra, mediana, quartis (25 e 75) e significância estatística (*P*) para as imunexpressões de galectina-1 e Bcl-2 no revestimento epitelial dos CRs, de acordo com o tratamento endodôntico prévio, padrão de revestimento do epitélio e intensidade do infiltrado inflamatório. 34
- Tabela 3 - Tamanho da amostra, mediana, quartis (25 e 75) e significância estatística (*P*) para as imunexpressões de galectina-1 e Bcl-2 na cápsula fibrosa dos CRs, de acordo com o tratamento endodôntico prévio, padrão de revestimento do epitélio e intensidade do infiltrado inflamatório. 34
- Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Spearman (*r*) e significância estatística (*P*) para as imunexpressões de galectina-1 e Bcl-2 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa dos CRs sem tratamento endodôntico e refratários ao tratamento endodôntico. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl-2	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i> , traduzido como célula-B de linfoma 2.
CR	Cisto Radicular.
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidratos.
Gal-1	Galectina-1
H.E	Hematoxilina e eosina.
IL-13	Do inglês <i>interleukin-13</i> , traduzido como interleucina-13.
SCR	Sistema de Canais Radiculares.
SPSS	Do inglês <i>statistical package for the social sciences</i> , traduzido como pacote de serviço estatístico para as ciências sociais.
STAT6	Do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 6</i> , traduzido como transdutor de sinais e ativador de transcrição.
TLR	Do inglês <i>Toll Like Receptor</i> , traduzido como receptores toll-like.
TNF- α	Do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i> , traduzido como fator de necrose tumoral alfa.
TRIS-HCL	Tris (hidroximetil) aminometano – ácido clorídrico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CISTO RADICULAR (CR).....	16
1.2	APOPTOSE E BCL-2.....	17
1.3	GALECTINAS.....	18
2	PREÂMBULO	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	23
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	23
4.3	LOCAL DO ESTUDO.....	23
4.4	POPULAÇÃO.....	23
4.5	AMOSTRA.....	23
4.6	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	24
4.6.1	Crítérios de inclusão.....	24
4.6.2	Crítérios de exclusão.....	24
4.7	ESTUDO MORFOLÓGICO.....	24
4.8	VARIÁVEIS.....	26
4.9	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	26
4.9.1	Técnica imunoistoquímica.....	26
4.9.2	Análise imunoistoquímica.....	28
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5	RESULTADOS	30
5.1	ANÁLISE CLÍNICA E MORFOLÓGICA.....	30
5.2	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	31
5.2.1	Imunoexpressão de galectina-1.....	31
5.2.2	Imunoexpressão de Bcl-2.....	34
5.2.3	Correlação entre as imunoexpressões de gal-1 e Bcl-2.....	35
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS	41

APÊNDICE A - FICHA PARA COLETA DE DADOS MORFOLÓGICOS DOS CRS DE DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE E CRS DE DENTES NÃO TRATADOS ENDODONTICAMENTE	44
APÊNDICE B - FICHA PARA COLETA DE DADOS REFERENTES À ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PELOS ANTICORPOS EM CRS DE DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE E CRS DE DENTES NÃO TRATADOS ENDODONTICAMENTE	45
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 CISTO RADICULAR (CR)

Os CRs são caracterizados como cistos odontogênicos de origem inflamatória associados a um dente não-vital (EL-NAGGAR, *et al.*, 2017). Grossmann *et al.* (2007) e Johnson *et al.* (2013), afirmaram que os CRs representam o tipo mais comum de cistos odontogênicos encontrados nos ossos gnáticos, correspondendo, nestes estudos, a 61% e 54,6% destas patologias.

Segundo Alcântara *et al.* (2013), os CRs são formados a partir da proliferação dos restos epiteliais de Malassez em lesões periapicais causadas pela infecção do SCR. Histologicamente, apresentam em geral, tecido epitelial de revestimento hiperplásico do tipo pavimentoso não ceratinizado, suportado por uma cápsula fibrosa, contendo um infiltrado inflamatório predominantemente crônico (KADAM *et al.*, 2014; BERNARDI *et al.*, 2015).

A extensão da proliferação do epitélio de revestimento na patogênese de um cisto parece estar relacionada aos fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias. No epitélio não proliferante, há menos infiltração de células inflamatórias. Portanto, existe uma estreita relação entre inflamação e hiperplasia epitelial (LIN *et al.*, 2009). Entretanto, o papel do tecido epitelial e conjuntivo, bem como o efeito da constituição fisiológica das células do estroma e da natureza transitória das células inflamatórias, no processo biológico de evolução da lesão cística ainda não estão claros (BERNARDI *et al.*, 2015).

Uma proposta para subdivisão dos CRs, considerando o padrão de revestimento epitelial, foi proposta por Cury *et al.* (1998). Segundo estes autores, os CRs podem ser classificados em atróficos, quando apresentam em sua maior extensão um epitélio constituído por 2 a 10 camadas de células de espessura e interface epitélio/cápsula plana. Já os cistos hiperplásicos são revestidos por epitélio estratificado escamoso, com espessura variável, possuindo mais de 10 camadas de células, e interface epitélio/cápsula arciforme.

As opções terapêuticas indicadas para os CRs variam desde o tratamento endodôntico convencional até a cirurgia parendodôntica. O objetivo é alcançar o reparo periapical, restaurando a arquitetura original e a função biológica do tecido injuriado. Após o tratamento endodôntico, o aparecimento ou a persistência de uma lesão periapical parece ser um critério utilizado para definir, a longo prazo, o insucesso do tratamento (LIN; ROSEMBERG, 2011).

O reparo dos CRs após terapia não cirúrgica do SCR ocorre, principalmente, através

da morte celular programada (LORETO *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2018). As células epiteliais presentes no revestimento epitelial dos CRs podem parar de proliferar pela redução de mediadores inflamatórios, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, decorrentes da ativação da apoptose ou dos sinais de morte recebidos durante o processo de reparo periapical (LORETO *et al.*, 2013).

1.2 APOPTOSE E BCL-2

Apoptose (derivada da palavra grega para o "cair" de folhas de uma árvore) é uma morte celular programada que desempenha um papel crucial no desenvolvimento, homeostase dos tecidos e imunidade. As manifestações morfológicas da apoptose incluem a formação de bolhas na membrana celular, encolhimento da célula e formação de corpos apoptóticos. A apoptose pode ser executada por três vias diferentes: a via extrínseca, a via intrínseca e a via induzida (NIRMALA; LOPUS, 2020).

O crescimento ou atividade inflamatória dos CRs depende do equilíbrio entre proliferação e morte de células epiteliais. Logo, a ausência de fatores ambientais favoráveis e a presença da apoptose podem atuar evitando a proliferação celular e, conseqüentemente, o crescimento da lesão (LOYOLA *et al.*, 2005; LEONI *et al.*, 2012).

Como peça central do programa apoptótico e o principal braço efetor do programa de morte celular está a família de proteínas relacionadas do linfoma de células B/leucemia-2 (Bcl-2). O membro protótipo desta família é Bcl-2, um acrônimo para gene linfoma de células B/leucemia-2, que foi descoberto pela primeira vez no ponto de quebra de t (14; 18) em um linfoma de células B folicular não Hodgkin. As proteínas codificadas pela família Bcl-2 localizam-se na membrana mitocondrial externa, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático (MARTINS *et al.*, 2011; PHULL; METGUD; PATEL, 2017).

Phull; Metgud; Patel (2017), detectaram a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em lesões odontogênicas como o ameloblastoma, o tumor ceratocisto odontogênico e o CR correlacionando as características histológicas e o potencial biológico dessas patologias.

Outros estudos também abordam a atuação de Bcl-2 no mecanismo programado de morte celular para controle homeostático da célula (MARTINS *et al.*, 2011; SOLUK TEKKESIN *et al.*, 2012; LORETO *et al.*, 2013). No entanto, nenhum estudo correlacionou a imunexpressão desta molécula apoptótica com as galectinas, que de acordo com Dhirapong *et al.* (2009) regulam vários processos celulares, incluindo apoptose e são encontradas em órgãos linfóides primários e secundários, além de células do sistema imunológico circulante, apoiando

seu papel na imunidade.

1.3 GALECTINAS

As galectinas correspondem à classe de lectinas mais amplamente expressas em todos os organismos e estão implicadas em muitos processos, incluindo as interações celulares, polaridade, tráfego de moléculas no meio intracelular e transdução de sinais (HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). São uma família de proteínas de ligação a β -galactosídeos solúveis, amplamente expressas em locais de inflamação, infecção e crescimento do tumor, surgindo como uma nova classe de DAMPs ou RAMPs que servem para amplificar ou resolver as respostas inflamatórias (YASEEN *et al.*, 2020).

Na maioria das circunstâncias, efeitos estimuladores ou inibidores variam de acordo com diferentes contextos de tecido, localização intracelular ou extracelular dessas proteínas e condições patológicas. Ilustrando este conceito, as gal-3 e gal-9 foram propostas para atuar como alarminas ou DAMPs que orquestram as respostas inflamatórias durante a sepse, infecção parasitária e neuroinflamação, além de exibir atividade imunoinibidora em microambientes tumorais (SUNDBLAD *et al.*, 2017).

A gal-1, a primeira galectina identificada, atua tipicamente como um mediador pró-resolução, reprimindo uma série de programas imunes inatos e adaptativos. Do ponto de vista estrutural, é composta por duas subunidades de 14,5 kDa presentes em um equilíbrio dinâmico de dimerização. Notavelmente, a expressão de gal-1 é proeminente em locais imunoprivilegiados, como placenta, testículos e no olho. É significativamente modulada para mais ou para menos em condições inflamatórias, incluindo infecção microbiana, autoimunidade, alergia, câncer, distúrbio reprodutivo, doenças neurodegenerativas e infarto do miocárdio (SUNDBLAD *et al.*, 2017).

Apresenta ampla distribuição em tecidos adultos e é expressa por macrófagos, células dendríticas, células T ativadas, células do estroma do timo, células endoteliais e células epiteliais, afetando processos de adesão de células imunes, migração, ativação, proliferação, diferenciação, apoptose, e sinalização, evidenciando o papel crítico, intra e extracelularmente, na resolução da inflamação (CARLOS *et al.*, 2018; ABEL, *et al.*, 2019; KRAUTTER, *et al.*, 2020).

Estudos sobre a galectina-1 em lesões císticas apenas o de Brito *et al.* (2018) que avaliaram as imunoexpressões das galectinas-1, -3 e -7 em granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos radiculares residuais, mostrando alta expressão de galectina-1 em células

do tecido conjuntivo, o que poderia estar relacionado a uma tentativa de controle local do processo inflamatório.

2 PREÂMBULO

As lesões periapicais são as patologias mais frequentes nos ossos gnáticos, e consistem em uma resposta inflamatória do tecido do hospedeiro à infecção bacteriana do sistema de canais radiculares (SCR), manifestando-se como cistos radiculares (CRs) e granulomas periapicais. As respostas teciduais e imunológicas são fundamentais para a proteção da disseminação de agentes infecciosos para outros locais. As bactérias causam danos diretos aos tecidos perirradiculares pela ação de exotoxinas, enzimas e metabólitos. No entanto, seus principais efeitos na patogênese das lesões periapicais têm grande probabilidade de estar relacionados a componentes estruturais celulares, além de outros fatores liberados que promovem danos indiretos aos tecidos, estimulando e modulando a resposta inflamatória do hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2013; ESTRELA *et al.*, 2014; DESSAUNE NETO *et al.*, 2018).

Martón e Kiss (2014) e Dill *et al.* (2015) descreveram que uma rede de fatores inibitórios e estimulatórios pode influenciar a intensidade de defesa e respostas inflamatórias, bem como o balanço entre a reabsorção e a regeneração óssea, resultando no reparo ou expansão das lesões periapicais.

O tratamento endodôntico contemporâneo visa preservar a funcionalidade e a estética dos dentes, sendo uma das intervenções dentais mais eficazes com alta taxa de sucesso. Todavia, em certos casos, esta terapia pode falhar, favorecendo a recorrência de sintomas clínicos e manutenção de área radiolúcida periapical (NESKOVIĆ *et al.*, 2016; KARAMIFAR; TONDARI; SAGHIRI, 2020).

Os estudos de Estrela *et al.* (2016) apontaram que as lesões refratárias ao tratamento endodôntico são biologicamente ativas, demonstrando potencial de reabsorção óssea. São caracterizadas por um perfil de células imunoinflamatórias, sugerindo um ambiente supressor e regulatório favorável a um comportamento clínico mais crônico.

Henriques *et al.* (2016) também demonstraram a complexa resposta imune envolvendo níveis expressivos de citocinas pró-inflamatórias que prevalece em lesões periapicais persistentes ou refratárias ao tratamento endodôntico.

Essas citocinas inflamatórias foram identificadas na camada epitelial de CRs, sugerindo um mecanismo para crescimento contínuo e atividade de reabsorção óssea moduladas por interleucinas e TNF- α . Embora o papel das citocinas inflamatórias na proliferação dos restos epitelial de Malassez para a formação do revestimento epitelial da cavidade cística já esteja definido, a função inflamatória em manter e estimular o crescimento de lesões císticas já estabelecidas precisa ser melhor esclarecido (SUNDBLAD *et al.*, 2017).

As respostas imunológicas envolvendo a interação entre citocinas anti-inflamatórias e de pró-resolução são rapidamente liberados em momentos de estresse celular e lesão do tecido para contrabalançar a inflamação exuberante, mitigar o dano ao tecido colateral e orquestrar a homeostase celular. (SUNDBLAD *et al.*, 2017). Como exemplo, a administração terapêutica de gal-1 suprime a inflamação crônica dependente de células T na artrite, na hepatite e na colite, sugerindo um potencial para uso terapêutico em doenças inflamatórias (BRINCHMANN; PATEL; IVERSEN, 2018).

Assim, o presente estudo teve como objetivo comparar e correlacionar a expressão das proteínas gal-1 e Bcl-2 em CRs refratários a tratamento endodôntico e em CRs de dentes não submetidos a tratamento endodôntico, no intuito de melhor compreender a resposta inflamatória das lesões periapicais através dos mecanismos imunorregulatórios.

A elucidação das vias bioquímicas e mecanismos reguladores da indução da apoptose através das proteínas gal-1 e Bcl-2 pode contribuir para o entendimento do comportamento biológico das lesões císticas e para estabelecimento de protocolos terapêuticos mais preditivos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar e correlacionar a expressão imunoistoquímica da gal-1 e Bcl-2 em CRs refratários ao tratamento endodôntico e dos CRs não submetidos à tratamento endodôntico, com o intuito de compreender o papel dessas proteínas na resposta inflamatórias das respectivas lesões.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão citoplasmática da gal-1 e Bcl-2 em células inflamatórias no compartimento tecidual (epitelial ou conjuntivo) dos CRs refratários a tratamento endodôntico e dos CRs não submetidos a tratamento endodôntico.
- Quantificar a expressão nuclear da gal-1 em células inflamatórias no compartimento tecidual (epitelial ou conjuntivo) dos CRs refratários a tratamento endodôntico e dos CRs não submetidos a tratamento endodôntico.
- Correlacionar a expressão da gal-1 e Bcl-2 em células inflamatórias de CRs refratários a tratamento endodôntico e dos CRs não submetidos a tratamento endodôntico especificamente no tocante à intensidade do infiltrado inflamatório e ao padrão do revestimento epitelial (atrófico ou hiperplásico).
- Correlacionar a expressão da gal-1 no compartimento de células inflamatórias (citoplasmático e nuclear) e a expressão da Bcl-2 em células inflamatórias no compartimento tecidual (epitelial ou conjuntivo) dos CRs refratários a tratamento endodôntico e dos CRs não submetidos a tratamento endodôntico.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisa envolvendo seres humanos (Plataforma Brasil) e foi submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, tendo sido aprovado sob o parecer de n.º 2.754.067 (Anexo A).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi observacional, analítico, com corte transversal, caracterizado pela análise imunohistoquímica das proteínas gal-1 e Bcl-2 em CRs de dentes submetidos a tratamento endodôntico e em CRs de dentes não submetidos a tratamento endodôntico.

4.3 LOCAL DO ESTUDO

Os estudos morfológico e imunohistoquímico foram realizados no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus Campina Grande.

4.4 POPULAÇÃO

A população deste estudo foi constituída pelos casos de CRs obtidos nos registros do Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)/Campus Recife, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)/Campus Natal, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)/Campus Campina Grande e Universidade de Fortaleza (UNIFOR)/Campus Fortaleza.

4.5 AMOSTRA

A amostra foi do tipo intencional e não-probabilística, constituída por 19 CRs de dentes submetidos a tratamento endodôntico e 19 CRs de dentes não submetidos a tratamento

endodôntico que, após coletadas, foram fixadas em formol a 10% e incluídas em blocos de parafina.

4.6 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

4.6.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo espécimes diagnosticados histopatologicamente como CRs, através da reavaliação das lâminas por um patologista oral, a fim de manter a concordância diagnóstica. Os espécimes exibiam uma cavidade patológica revestida total ou parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado, apresentando uma quantidade suficiente de cápsula de tecido conjuntivo fibroso, critério diagnóstico de acordo com Bernardi *et al.* (2015), para as avaliações morfológicas e imunoistoquímicas. Adicionalmente, houve a confirmação da informação referente aos casos tratados e não tratados endodonticamente, através das fichas de biópsia.

4.6.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os espécimes com dados clínicos incompletos, tais como idade, sexo, localização anatômica da lesão, realização de tratamento endodôntico, como também aqueles que apresentaram quantidade insuficiente de material biológico nos blocos parafinados.

4.7 ESTUDO MORFOLÓGICO

O estudo morfológico foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral da UEPB. Os espécimes teciduais foram cortados à 5µm de espessura e corados pela técnica de rotina da hematoxilina e eosina (HE). A análise objetivou a observação dos aspectos histopatológicos das lesões para que os casos fossem incluídos de acordo com os critérios estabelecidos.

Através da microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), os cortes foram avaliados nos aumentos de 40x, 100x e 400x por um examinador calibrado pela análise de concordância intraexaminador (Kappa) para os graus de

infiltrado inflamatório. Os dados da análise histomorfológica foram catalogados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007®).

A intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo e o padrão de revestimento epitelial nas lesões císticas foram os aspectos histopatológicos analisados. A referida intensidade foi avaliada de acordo com critérios de Peixoto *et al.* (2012), ou seja, espécimes cujo infiltrado inflamatório se apresentaram restritos à um terço do campo microscópico foram classificados como Grau I (leve infiltrado), as lesões com células inflamatórias presentes entre um e dois terços, como Grau II (moderado infiltrado) e as lesões que exibiram infiltrado inflamatório superior a dois terços, categorizadas como Grau III (intenso infiltrado).

O padrão de revestimento epitelial foi analisado de acordo com metodologia proposta por Moreira *et al.* (2000). Fundamentando-se no padrão predominante de cada caso, foram classificados como atróficos os cistos que exibiram, em sua maior extensão, a camada epitelial constituída por 2 a 10 camadas de células de espessura, e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial plana. Foram considerados como hiperplásicos os espécimes revestidos por epitélio com espessura variável possuindo mais de 10 camadas de células e interface entre a cápsula e o revestimento epitelial arciforme.

4.8 VARIÁVEIS

As variáveis dependentes e independentes avaliadas neste estudo estão descritas nos quadros 1 e 2, respectivamente:

Quadro 1 - Variáveis dependentes avaliadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Galectina-1	Percentual de células positivas	Citoplasmática/membranar Nuclear
Bcl-2	Percentual de células positivas	Citoplasmática/membranar

Fonte: autora (2021)

Quadro 2 - Variáveis independentes avaliadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Origem dos CRs	Lesão periapical crônica de origem inflamatória	CRs oriundos de dentes tratados endodonticamente CRs oriundos de dentes não tratados endodonticamente
Intensidade do infiltrado inflamatório	Intensidade de células presentes no campo microscópico	Grau I Grau II Grau III
Padrão de revestimento epitelial	Padrão de revestimento epitelial predominante encontrado na lesão	Atrófico Hiperplásico

Fonte: autora (2021)

4.9 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

4.9.1 Técnica imunoistoquímica

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro, limpas e preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxi-silano, Sigma Chemical CO, USA).

Em seguida, o material foi submetido à técnica imunoperoxidase baseada em polímeros de dextrano (ADVANCETM HRP, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando anticorpos monoclonais anti-galectina-1 e anti-Bcl-2, de acordo com especificidades dos fabricantes (Quadro 3).

Quadro 3 - Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectina-1 e anti-Bcl-2.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Galectina-1	C45	Santa Cruz Biotechnology	1:2500	Citrato, pH 6,0	Overnight

				<i>Steamer, 90°C, 30 min</i>	
Bcl-2	124	Dako	1:150	Tris/EDTA, pH 9,0 <i>Steamer, 90°C, 30 min</i>	Overnight

Fonte: autora (2021)

A análise da expressão imunoistoquímica da proteína Bcl-2 nos CRs refratários a tratamento endodôntico e CRs de dentes não submetidos a tratamento endodôntico foi fundamentada na positividade da marcação no compartimento epitelial e celular, sendo consideradas positivas todas as células (epiteliais e inflamatórias) que apresentaram pigmentos de coloração acastanhada no compartimento citoplasmático/membranar.

No tocante à gal-1, foram consideradas positivas as células epiteliais e inflamatórias dos compartimentos tecidual e celular que apresentaram coloração acastanhada na porção citoplasmática e/ou nuclear.

Como controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de tonsilas para ambos os anticorpos. Para o controle negativo, as amostras foram tratadas como anteriormente descrita, exceto pela omissão dos anticorpos primários no protocolo de imunoistoquímica.

A técnica de imunoistoquímica realizada no Laboratório de Patologia Oral da UEPB, seguiu o protocolo a seguir:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol aquecido (15 minutos cada);
- ⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (ver protocolo/ livro de registro);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*EnVision™ Flex antibody diluent, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida;
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário polimerizado à peroxidase (*EnVision™ Flex/ HRP, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*EnVision™ Flex DAB+, 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 polímero de acrilatos (*Entellan® new, Merck KGaA, Darmstadt, DE*).

4.9.2 Análise imunoistoquímica

A análise da expressão imunoistoquímica dos biomarcadores nos compartimentos citoplasmático e nuclear das células epiteliais e inflamatórias dos CRs refratários a tratamento endodôntico e CRs de dentes não submetidos a tratamento endodôntico foi realizada por um observador previamente calibrado por análise de concordância intraexaminador (Kappa).

As avaliações das imunorexpressões dos biomarcadores pesquisados foram estabelecidas mediante análise de 5 campos microscópicos com maior imunorreatividade para os componentes epiteliais e de 5 campos microscópicos com maior imunorreatividade no infiltrado inflamatório do componente conjuntivo, avaliados em todas as lesões no aumento de 200x no microscópio de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE).

Na sequência, foram fotomicrografados os 10 campos microscópicos representativos das lesões em alta ampliação, 400X, no microscópio de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por um examinador. O programa ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) foi utilizado para processamento das imagens e contagem das células epiteliais e inflamatórias positivas e negativas para os anticorpos estudados, avaliando os compartimentos citoplasmático e nuclear para gal-1 e o compartimento citoplasmático para a proteína Bcl-2, separadamente, a fim de estabelecer o índice percentual de células exibindo imunopositividade citoplasmática e nuclear para cada caso, seguindo metodologia de Brito *et al.* (2018).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (Versão 20.0, IBM SPPS Inc., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para gal-1 e Bcl-2 foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, que 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 gal-1 e Bcl-2, de acordo com os grupos de CRs e suas características histopatológicas. Possíveis correlações entre as imunorexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE CLÍNICA E MORFOLÓGICA

Os resultados clínicos e morfológicos estão apresentados na Tabela 1 abaixo. Sobre os CRs não submetidos à tratamento endodôntico, 11 casos foram diagnosticados em mulheres (57,9%) e 8 casos em homens (42,1%). A idade do paciente variou de 13 a 75 anos, com média de $36,2 \pm 17,1$ anos. Para os casos de CRs refratários a tratamento endodôntico, 13 foram diagnosticados em mulheres (68,4%) e 6 em homens (31,6%). A idade do paciente variou de 15 a 60 anos, com média de $33,3 \pm 12,1$.

Quanto à localização anatômica, dos CRs não submetidos à tratamento endodôntico, 15 dos casos foram na maxila (78,9%) e 4 dos casos, na mandíbula (21,1%). Todos os casos de CRs refratários ao tratamento endodôntico estavam localizados na maxila. O tempo decorrente do tratamento endodôntico e diagnóstico histopatológico destes CRs, variou de 6 a 132 meses, com média de $35,6 \pm 45,3$.

A análise morfológica do revestimento epitelial revelou distribuição semelhante para os dois grupos de CRs estudados: 11 casos apresentaram epitélio hiperplásico (57,9%) e 8 dos casos exibiram epitélio atrófico (42,1%).

Na análise do infiltrado inflamatório nos CRs não submetidos à tratamento endodôntico, 11 apresentaram infiltrado inflamatório Grau III (57,9%) e 8 casos exibiram infiltrado inflamatório Grau I/II (42,1%). Nos CRs refratários ao tratamento endodôntico, 13 dos casos indicaram infiltrado inflamatório Grau I/II (68,4%) e 6 casos revelaram infiltrado inflamatório Grau III (31,6%).

Tabela 1 - Distribuição dos casos de CRs sem tratamento endodôntico e refratários ao tratamento endodôntico de acordo com as características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	Sem tratamento	Refratário ao tratamento
<i>Idade (em anos)</i>		
Variação	13 – 75	15 – 60
Média ± desvio padrão	36,2 ± 17,1	33,3 ± 12,1
<i>Sexo</i>		
Feminino	11 (57,9%)	13 (68,4%)
Masculino	8 (42,1%)	6 (31,6%)
<i>Localização anatômica</i>		
Maxila	15 (78,9%)	19 (100,0%)
Mandíbula	4 (21,1%)	0 (0,0%)
<i>Tempo de tratamento endodôntico (em meses)*</i>		
Variação	NA	6 – 132
Média ± desvio padrão	NA	35,6 ± 45,3
<i>Padrão do revestimento epitelial</i>		
Atrófico	8 (42,1%)	8 (42,1%)
Hiperplásico	11 (57,9%)	11 (57,9%)
<i>Intensidade do infiltrado inflamatório</i>		
Grau I/ II	8 (42,1%)	13 (68,4%)
Grau III	11 (57,9%)	6 (31,6%)

Legenda: NA – Não se aplica.

* Informação sobre o tempo de tratamento não estava disponível em 8 casos.

Fonte: autora (2021)

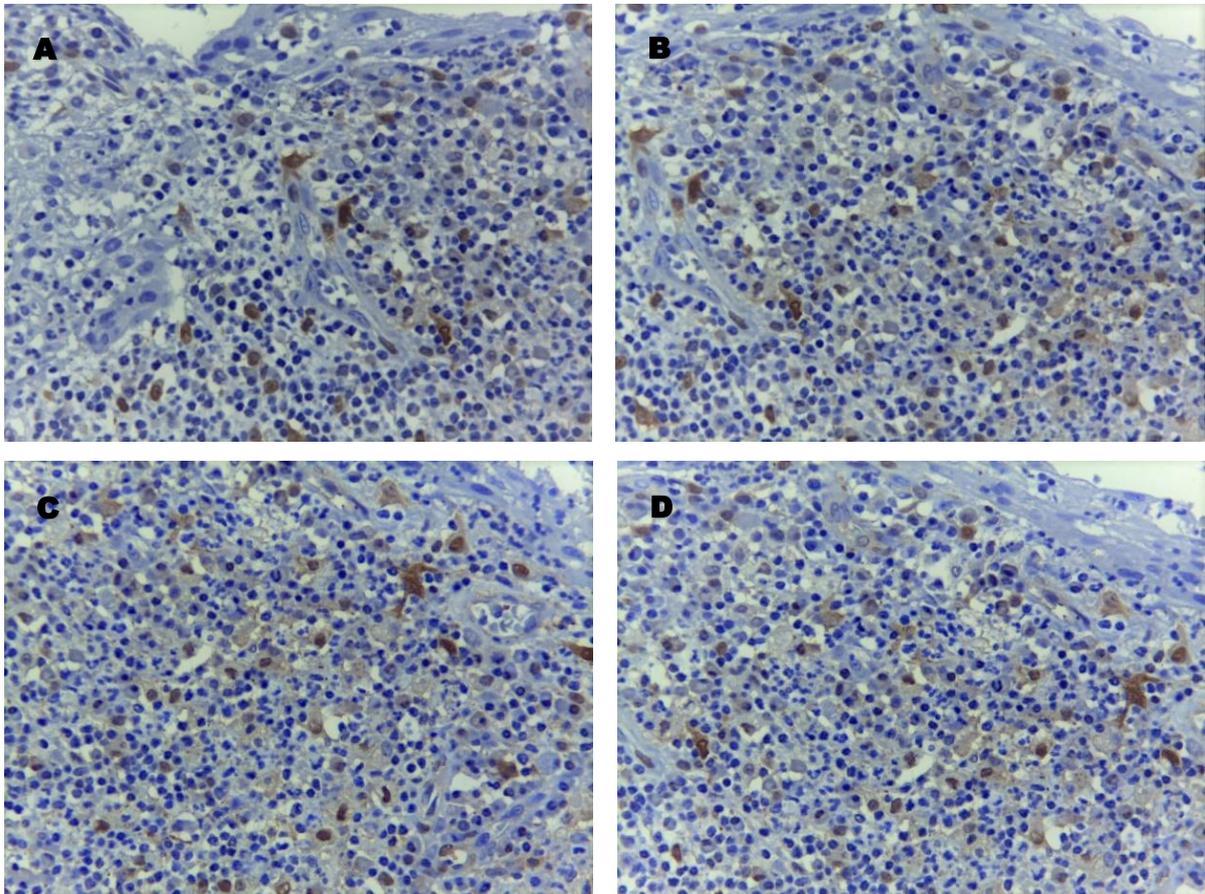
5.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

5.2.1 Imunoexpressão de galectina-1

No revestimento epitelial foi observada a imunoexpressão de gal-1 em todos os casos de CRs sem tratamento endodôntico e em 18 dos CRs refratários ao tratamento endodôntico (94,7%) (Figura 1). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade para gal-1 entre os CRs sem tratamento

endodôntico e refratários ao tratamento, tanto para a avaliação em citoplasma ($P = 0,249$) quanto em núcleo ($P = 0,404$) (Tabela 2).

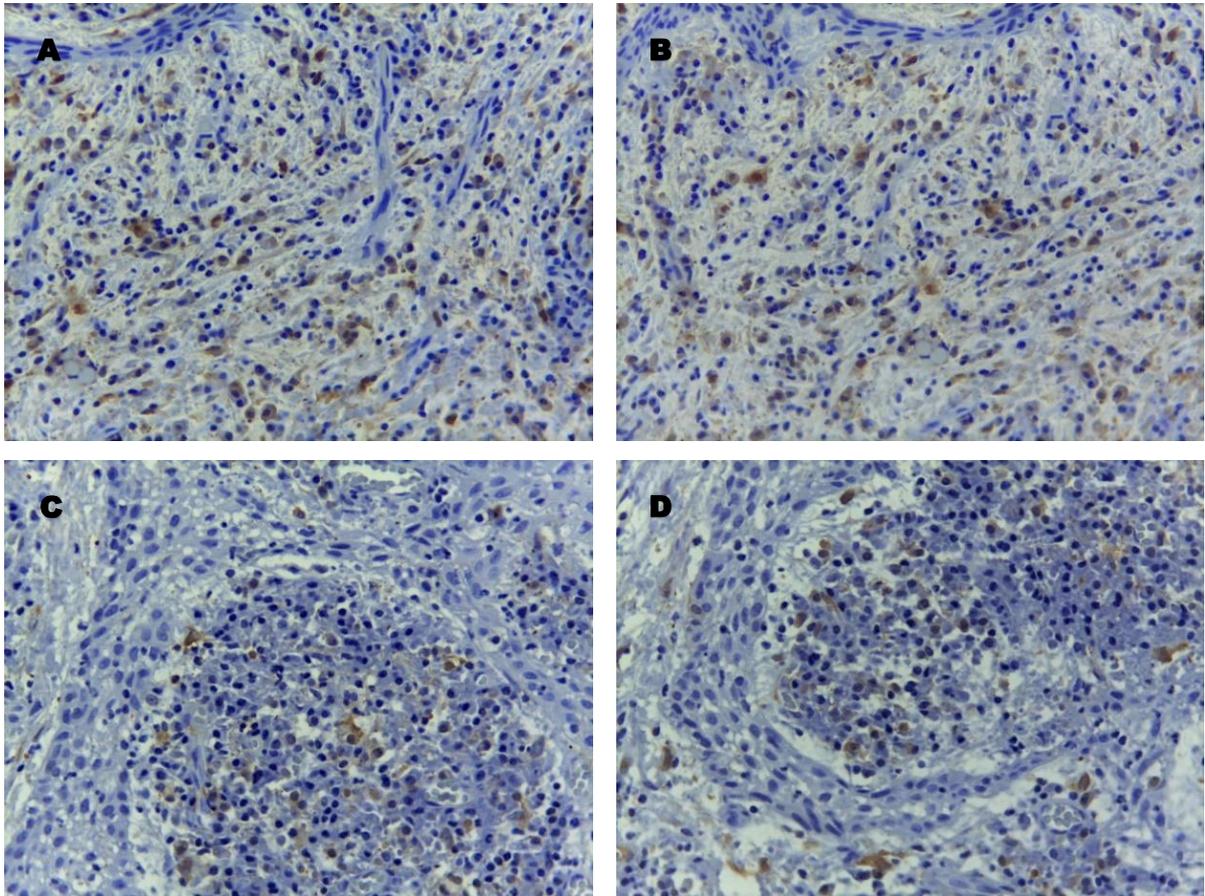
Figura 1 - Fotomicrografias da imunexpressão de galectina-1 em CRs não submetidos à tratamento endodôntico. (A) e (B) Células do revestimento epitelial hiperplásico exibindo expressão citoplasmática e nuclear (x400). (C) e (D) Infiltrado inflamatório intenso evidenciando expressão citoplasmática e nuclear na cápsula fibrosa.



Fonte: autora (2021)

Na cápsula fibrosa foi constatada imunexpressão de gal-1 em todos os casos de CRs avaliados no presente estudo, com positividade em células inflamatórias (Figura 2).

Figura 2 - Fotomicrografias da imunoposição de galectina-1 em CRs refratários ao tratamento endodôntico. (A) e (B) Cápsula fibrosa evidenciando infiltrado inflamatório Grau III e expressão nuclear em células inflamatórias (x200). (C) e (D) Células inflamatórias próximas ao revestimento epitelial hiperplásico exibindo expressão nuclear (x400).



Fonte: autora (2021)

A análise dos percentuais de imunopositividade citoplasmática para gal-1, revelou expressão significativamente superior nos CRs sem tratamento endodôntico quando comparados aos CRs refratários ao tratamento ($P = 0,045$) (Tabela 3). Por sua vez, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade nuclear para gal-1 entre os grupos de CRs ($P = 0,630$) (Tabela 3).

Em relação aos aspectos histopatológicos dos CRs (padrão do revestimento epitelial e intensidade do infiltrado inflamatório), foram identificadas diferenças estatisticamente significativas apenas para os percentuais de imunoposição nuclear de gal-1 no revestimento epitelial das lesões. Nesse sentido, CRs com infiltrado inflamatório Grau III apresentaram maiores percentuais de positividade nuclear para gal-1 no revestimento epitelial quando comparados a CRs com infiltrado inflamatório Grau I/II ($P = 0,007$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Tamanho da amostra, mediana, quartis (25 e 75) e significância estatística (*P*) para as imunoexpressões de galectina-1 e Bcl-2 no revestimento epitelial dos CRs, de acordo com o tratamento endodôntico prévio, padrão do epitélio e intensidade do infiltrado inflamatório.

Localização/ Variáveis	n	Galectina-1				Bcl-2	
		Citoplasma		Núcleo		Mediana (Q25-Q75)	<i>P</i>
		Mediana (Q25-Q75)	<i>P</i>	Mediana (Q25-Q75)	<i>P</i>		
<i>Tratamento endodôntico</i>							
Não	19	1,4 (0,6 – 3,6)	0,249	2,2 (0,6 – 3,4)	0,404	23,3 (16,3 – 41,7)	0,895
Sim	19	1,3 (0,2 – 2,1)		0,9 (0,2 – 3,7)		22,8 (11,9 – 59,8)	
<i>Padrão do epitélio</i>							
Atrófico	16	1,8 (0,2 – 4,9)	0,564	0,8 (0,0 – 3,1)	0,100	17,2 (12,3 – 39,0)	0,183
Hiperplásico	22	1,3 (0,6 – 1,8)		2,6 (0,6 – 3,7)		26,5 (15,3 – 61,6)	
<i>Infiltrado inflamatório</i>							
Grau I/ II	21	0,9 (0,2 – 2,3)	0,186	0,7 (0,1 – 2,5)	0,007	17,1 (11,3 – 38,5)	0,138
Grau III	17	1,5 (0,9 – 3,4)		3,3 (1,9 – 4,7)		35,3 (20,9 – 52,7)	

Fonte: autora (2021)

Tabela 3 - Tamanho da amostra, mediana, quartis (25 e 75) e significância estatística (*P*) para as imunoexpressões de galectina-1 e Bcl-2 na cápsula fibrosa dos CRs, de acordo com o tratamento endodôntico prévio, padrão do epitélio e intensidade do infiltrado inflamatório.

Localização/ Variáveis	n	Galectina-1				Bcl-2	
		Citoplasma		Núcleo		Mediana (Q25-Q75)	<i>P</i>
		Mediana (Q25-Q75)	<i>P</i>	Mediana (Q25-Q75)	<i>P</i>		
<i>Tratamento endodôntico</i>							
Não	19	5,2 (3,4 – 8,9)	0,045	5,9 (4,6 – 10,9)	0,630	55,7 (46,5 – 62,1)	0,804
Sim	19	1,9 (0,4 – 7,1)		7,1 (2,6 – 10,0)		53,9 (46,3 – 66,8)	
<i>Padrão do epitélio</i>							
Atrófico	16	5,2 (1,1 – 8,8)	0,416	7,5 (3,0 – 13,3)	0,515	49,8 (40,6 – 58,0)	0,033
Hiperplásico	22	3,8 (1,3 – 6,5)		6,3 (2,8 – 9,7)		60,7 (49,7 – 69,0)	
<i>Infiltrado inflamatório</i>							
Grau I/ II	21	3,4 (0,5 – 6,7)	0,100	5,4 (2,4 – 11,7)	0,355	55,7 (42,4 – 64,0)	0,567
Grau III	17	5,2 (2,2 – 10,3)		7,1 (5,5 – 10,4)		53,9 (47,8 – 65,8)	

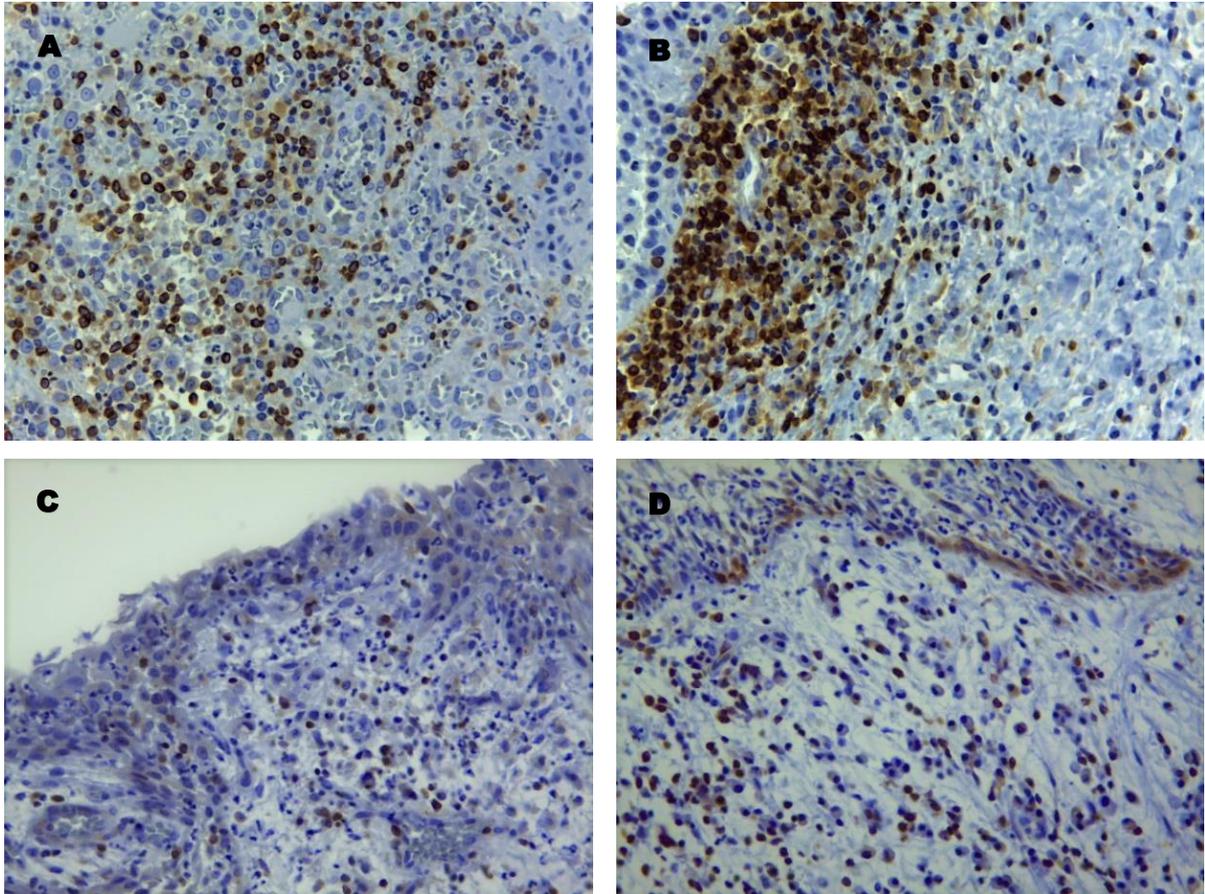
Fonte: autora (2021)

5.2.2 Imunoexpressão de Bcl-2

Foi observada imunoexpressão de Bcl-2 em todos os casos de CR avaliados no presente estudo, tanto no revestimento epitelial quanto na cápsula fibrosa (Figura 3). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade para Bcl-2 entre CRs sem tratamento endodôntico e refratários ao tratamento, tanto para a

avaliação em revestimento epitelial ($P = 0,895$) quanto em cápsula fibrosa ($P = 0,804$) (Tabelas 2 e 3).

Figura 3 - Fotomicrografias da imunexpressão de Bcl-2 em CRs com revestimento hiperplásico. (A) e (B) Alta expressão citoplasmática no infiltrado inflamatório da cápsula fibrosa (x400). (C) e (D) Expressão citoplasmática em células epiteliais do revestimento epitelial (x400).



Fonte: autora (2021)

Com relação às características histopatológicas dos CRs (padrão do revestimento epitelial e intensidade do infiltrado inflamatório), foram identificadas diferenças estatisticamente significativas apenas para os percentuais de imunexpressão de Bcl-2 na cápsula fibrosa dos CRs com revestimento epitelial hiperplásico quando comparados a CRs com revestimento atrófico ($P = 0,033$) (Tabela 3).

5.2.3 Correlação entre as imunexpressões de galectina-1 e Bcl-2

As correlações entre as imunorexpressões de gal-1 e Bcl-2 nos CRs estão apresentadas na Tabela 5. No grupo dos CRs refratários ao tratamento endodôntico, foi observada correlação positiva entre as imunorexpressões citoplasmática e nuclear de gal-1 no revestimento epitelial ($r = 0,746$; $P < 0,001$). Nos CRs sem tratamento endodôntico não foram constatadas correlações estatisticamente significativas entre as imunorexpressões de gal-1 e Bcl-2 ($P > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (P) para as imunorexpressões de galectina-1 e Bcl-2 no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa dos CRs sem tratamento endodôntico e refratários ao tratamento endodôntico.

Localização/ Correlações	CR sem tratamento		CR refratário ao tratamento	
	r	P	r	P
<i>Revestimento epitelial</i>				
Galectina-1 (citoplasma) x galectina-1 (núcleo)	0,350	0,142	0,746	< 0,001
Galectina-1 (citoplasma) x Bcl-2	0,284	0,238	- 0,057	0,817
Galectina-1 (núcleo) x Bcl-2	- 0,131	0,594	0,293	0,223
<i>Cápsula fibrosa</i>				
Galectina-1 (citoplasma) x galectina-1 (núcleo)	0,340	0,154	0,040	0,869
Galectina-1 (citoplasma) x Bcl-2	- 0,274	0,257	0,354	0,137
Galectina-1 (núcleo) x Bcl-2	- 0,119	0,627	0,028	0,909

Fonte: autora (2021)

6 DISCUSSÃO

A gal-1, membro da família das galectinas com especificidade para beta-galactosídeos, tem fortes propriedades imunomoduladoras por regular as interações célula-matriz e a apoptose de células T ativadas (CABALLERO *et al.*, 2020). A proteína Bcl-2, por sua vez, apresenta atividade antiapoptótica ao inibir a morte celular programada, sem promoção simultânea da proliferação (ORIKPETE; OMOREGIE; OJO, 2020). A compreensão dos papéis de Bcl-2 e, sobretudo, da gal-1 no comportamento biológico de lesões císticas não submetidas a tratamento endodôntico e refratárias ao tratamento endodôntico não está bem estabelecida.

Nesse sentido, os resultados desta pesquisa evidenciaram a participação da gal-1 e Bcl-2 nas respostas imunológicas dos grupos de lesões estudadas. A gal-1 apontou maior expressão citoplasmática nos CRs sem tratamento endodôntico e imunoexpressão nuclear significativamente maior nos CRs com infiltrado inflamatório Grau III, no padrão de revestimento epitelial hiperplásico. Os CRs refratários ao tratamento endodôntico evidenciaram correlação positiva entre as imunoexpressões citoplasmática e nuclear da gal-1 no revestimento epitelial.

No tocante à Bcl-2, foram identificadas diferenças estatisticamente significativas apenas para os percentuais de imunoexpressão na cápsula fibrosa dos CRs com revestimento epitelial hiperplásico, quando comparados a CRs com revestimento atrófico. Tal achado sugere que as células epiteliais presentes no revestimento epitelial dos CRs podem parar de proliferar pela redução de mediadores inflamatórios, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, decorrentes da ativação da apoptose ou dos sinais de morte recebidos durante o processo de reparo periapical (LORETO *et al.*, 2013).

Os resultados da análise clínica do presente estudo mostraram que os grupos de CRs foram diagnosticados com mais frequência na maxila e no sexo feminino, de acordo com estudos anteriores (AKINYAMOJU; GBADEBO; ADEYEMI, 2014; TAVARES *et al.*, 2017).

Morfologicamente, os CRs refratários ao tratamento endodôntico exibiram, em sua maioria, infiltrado inflamatório Grau I/II, sugerindo que mesmo sem o êxito da terapia instituída, houve redução na intensidade do infiltrado inflamatório. Ao passo que os CRs não submetidos a tratamento endodôntico apresentaram infiltrado inflamatório Grau III, apontando que a permanência do estímulo antigênico contribui para a intensidade do infiltrado inflamatório, o que também justificaria a predominância do revestimento epitelial hiperplásico (LIN; HUANG; ROSENBERG, 2007; FREITAS *et al.*, 2020).

A análise imunistoquímica no revestimento epitelial resultou na imunopositividade para a gal-1 em ambos os grupos de CRs, sem diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de imunopositividade em relação ao compartimento celular, tal qual o estudo de Brito *et al.* (2018), indicando a sua provável participação nos mecanismos de resolução inflamatória das lesões de ambos os grupos.

Law *et al.* (2020) ressaltaram a hipótese de que, além das suas reconhecidas ações antiinflamatórias, a gal-1 também possui propriedades pró-resolução por meio de suas ações no tráfego de neutrófilos e vida útil dos mesmos. Utilizando um modelo bem caracterizado de peritonite induzida por zimosan, demonstraram que na ausência de gal-1 ocorreu o aumento do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, ao passo que na administração de gal-1 recombinante após o pico de inflamação, foi induzida a apoptose e depuração de neutrófilos.

Zhang *et al.* (2021) fizeram um estudo em pacientes com periodontite, onde a interleucina (IL) -17 estava significativamente aumentada em comparação aos controles, enquanto a gal-1 era menor. Interessantemente, verificou-se que o tratamento com gal-1 reduziu os níveis sistêmicos de IL-17. A superexpressão de gal-1 atenuou a inflamação, autofagia celular e apoptose induzida por LPS, além de reduzir as expressões de interleucinas, fornecendo novos insights sobre a compreensão da patogênese da periodontite, tornando-se potencial promissor na regeneração do periodonto.

Os expressivos percentuais de positividade em células inflamatórias corroboram Krautter *et al.* (2020), cujos estudos enfatizaram que em processos inflamatórios, macrófagos ativadas e células T estimuladas por antígenos produziram altos níveis de gal-1 a fim de eliminar células T efectoras, modulando respostas inflamatórias e mantendo a integridade e função dos tecidos.

A apoptose de células T ativadas (preparadas com antígeno) é induzida pela gal-1 de uma maneira dependente de CD45, e a homeostase das células T pode ser regulada pela gal-1 através da inibição da expansão clonal e indução de apoptose. A apoptose de células T ativadas induzida por galectina-1 é dependente da caspase-8 e -9. Curiosamente, as próprias células T ativadas podem produzir gal-1 através de MEK1/ERK, p38 MAP quinase e vias de sinalização da p70S6 quinase, sugerindo que este é um mecanismo autócrino de suicídio usado para encerrar uma resposta imune efectora. Por outro lado, as células T em repouso podem se ligar à gal-1, sem indução de apoptose (BRINCHMANN; PATEL; IVENSEN, 2018).

De acordo com Sundblad *et al.* (2017) e Pasmatis *et al.* (2019), na maioria das circunstâncias, os efeitos estimuladores ou inibidores variam de acordo com diferentes

contextos de tecido, localização intracelular ou extracelular dessas proteínas, condições patológicas e expressão espaço-temporais de outros programas regulatórios.

Os resultados das investigações apontaram diferença estatisticamente significativas apenas para os percentuais de imunoposição nuclear desta proteína no revestimento epitelial das lesões, sugerindo novos estudos para fundamentar sua participação no desenvolvimento e diferenças patogênicas entre os grupos de lesões císticas.

Os desfechos do estudo para a Bcl-2 indicaram que houve imunopositividade tanto em CRs não submetidos à tratamento endodôntico, quanto em refratários ao tratamento endodôntico nos compartimentos epitelial e conjuntivo, demonstrando a atividade anti-apoptótica nessas lesões periapicais que perpetuam a infecção bacteriana no sistema de canais radiculares (FREITAS *et al.*, 2020).

A imunoposição de Bcl-2 nas camadas basais dos CRs está de acordo com os achados de Phull; Metgud; Patel (2017) que verificaram a expressão de bcl-2 e sua distribuição nas células epiteliais das camadas basais e nas células do tecido conjuntivo de ameloblastoma, ceratocisto e cisto radicular, relacionando características histopatológicas ao potencial biológico destas lesões.

O presente estudo aponta ainda que a imunoposição de Bcl-2 foi mais exuberante na cápsula fibrosa dos CRs com revestimento epitelial hiperplásico em relação aos CRs com revestimento atrófico, validando o potencial proliferativo na camada epitelial e eventos anti-apoptóticos no infiltrado inflamatório (SUZUKI *et al.*, 2005; LUKSCHAL; LEAL, 2012; OZTURK *et al.*, 2019).

7 CONCLUSÕES

A presença de gal-1 nos compartimentos teciduais (epitelial e conjuntivo) e celulares (citoplasma/núcleo) dos CRs não submetidas a tratamento endodôntico e refratários ao tratamento endodôntico avaliadas no estudo, pode indicar sua atuação na mitigação das respostas inflamatórias não resolvidas, sugerindo a necessidade de mais estudos para estabelecer seu papel no comportamento biológico das lesões císticas.

A exuberância da imunexpressão de Bcl-2 na cápsula fibrosa dos CRs com padrão de revestimento epitelial hiperplásico parece estar relacionada à manutenção de estímulo antigênico e consequente proliferação celular.

Não foi visto correlação das imunexpressões de gal-1 e Bcl-2 no revestimento epitelial e cápsula fibrosa no grupo lesões císticas estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, B.A.R.; CARLI, M.L.; BEIJO, L.A. et al. Correlation between inflammatory infiltrate and epithelial lining in 214 cases of periapical cysts. **Braz Oral Res**, v. 27, n. 6, p. 490-5, Nov 2013.
- ANDRADE, A.L. et al. Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box p3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **J Endod**, v. 39, n. 8, p. 990-4, 2013.
- AKINYAMOJU, A.O.; GBADEBO, S.O.; ADEYEMI, B.F. Periapical lesions of the jaws: a review of 104 cases in *Ibidan*. **Ann Ib Postgrad Med**, v. 12, n. 2, p. 115-9, Dec 2014.
- BRINCHMANN, M.F.; PATEL, D.M.; IVERSEN, M.H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. **Mediators Inflamm**. v. 21, p. 1–11, 2018.
- BRITO, L.N.S. et al. Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **J Endod**, v. 44, n. 5, p.728-33, 2018.
- CABALLERO, G.G. et al. How galectins have become multifunctional proteins. **Histol Histopathol**, v. 35, n.6, p. 509-39, Jun 2020.
- CARLOS, C.P. et al. Pharmacological treatment with galectin-1 protects against renal ischaemia-reperfusion injury. **Sci Rep**, v. 8, n.1, p. 9568, 2018.
- CURY, V.C.F. et al. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. **J Endod**, v. 24, n.1, p.36-7, Jan 1998.
- DESSAUNE NETO, N. et al. Pro-inflammatory and antiinflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. **J Appl Oral Sci**, v. 26, 2018.
- DHIRAPONG, A. et al. The immunological potential of galectin-1 and-3. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 5, p.360-3, Mar 2009.
- DILL, A. et al. Analysis of multiple cytokine polymorphisms in individuals with untreated deep carious lesions reveals IL1B (rs1143643) as a susceptibility factor for periapical lesion development **J Endod**, v. 41, n. 2, p. 197-200, Feb 2015.
- EL-NAGGAR, A.K.; CHAN, J.K.C.; GRANDIS, J.R. et al. WHO Classification Head and Neck Tumour, **Lyon: IARC press**, 2017.
- ESTRELA, C. et al. Detection of apical inflammatory root resorption associated with periapical lesion using different methods. **Braz Dent J**, v. 25, n. 5, p 404-8, Oct 2014.
- 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. **J Endod**, v. 42, n. 3, Mar 2016.
- FREITAS C.T. Myofibroblasts and increased angiogenesis contribute to periapical cystic injury containment and repair. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 25, n. 5, p. e584-e91, Sep 2020

GROSSMANN, S.M. et al. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.104, n. 6, p. 35-41, Dec, 2007.

HENRIQUES L.C. et al. Microbial ecosystem analysis in root canal infections refractory to endodontic treatment. **J Endod**, v. 42, n. 8, p. 1239-45, Aug 2016.

JOHNSON, N.R. et al. A prospective epidemiological study for odontogenic and non-odontogenic lesions of the maxilla and mandible in Queensland. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 115, n. 4, p. 515-2, Apr 2013.

KADAM, N.S. et al. Management of large radicular cyst by conservative surgical approach: a case report. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 2, p. 239-41, Feb 2014.

KARAMIFAR, K.; TONDARI, A.; SAGHIRI, M.A. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. **EUR Endod J**, v. 2, p. 54-67, 2020.

LAW, H.L. et al. A Pro-resolving Role for Galectin-1 in Acute Inflammation. **Front Pharmacol**, v. 11; n. 20, p. 274–. Mar 2020.

LIN, L.M., HUANG G.T., ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **J Endod**, v. 33, n. 8, p. 908-16, Aug 2007.

LIN, L.M. et al. Nonsurgical Root Canal Therapy of Large Cyst-like Inflammatory Periapical Lesions and Inflammatory Apical Cysts. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 607-15, May 2009.

LIN, L.M.; ROSENBERG, P.A. Repair and regeneration in endodontics. **Int Endod J**, v. 44; n. 10; p. 889-906, Out 2011.

LORETO, C. et al. Possible role of apoptosis in the pathogenesis and clinical evolution of radicular cyst: an immunohistochemical study. **Int Endod J**, v. 46, n. 7, p. 642-8, 2013.

LOYOLA, A.M. et al. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. **Int Endod J**, v. 38, n. 7, p. 465-469, 2005.

LUKSCHAL, L.F.; LEAL, R. Avaliação do índice apoptótico em epitélio atrófico e hiperplásico dos cistos periapicais Apoptotic index in periapical cysts with atrophic and hyperplastic epithelium. **Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac**, v. 12, n. 4, p. 91-8, Out.-Dez 2012.

NESKOVIĆ, J. et al. Outcome of orthograde endodontic retreatment--A two-year follow-up. **Srp Arh Celok Lek**, v. 144, n. 3-4, p. 174-180, Mar-Apr 2016.

MARTINS, C.A. et al. Immunohistochemical detection of factors related to cellular proliferation and apoptosis in radicular and dentigerous cysts. **J Endod**, v. 37, n. 1, p. 36-9, 2011.

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

ORIKPETE, E.V.; OMOREGIE, O.F.; OJO, M.A. Proliferative and anti-apoptotic indices of unicystic ameloblastoma, odontogenic keratocyst, dentigerous cyst and radicular cyst. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 24, n. 2, p. 339, May-Aug 2020.

OZTURK, M. et al. Immunohistochemical evaluation of the effect of acitretin and systemic steroid treatments on Ki-67, Bcl-2, and COX-2 levels in cutaneous lichen planus patients. **Int J Dermatol**, v. 58, n. 12, p. 1444-50, Dec 2019.

PASMATZI, E. et al. Galectin 1 in dermatology: current knowledge and perspectives. **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat**, v. 28, n. 1, p. 27-31, Mar 2019.

PEIXOTO, R.F. et al. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 9, p. 1159-64, Sep 2012.

PHULL, K.; METGUD, R.; PATEL, S. A study of the distribution of B-cell lymphoma/leukemia-2 in odontogenic cyst and tumors: Histochemical study. **J Cancer Res Ther**. v. 13; n. 3; p. 570-5, Jul-Sep 2017.

SANTOS, L.C. et al. Histopathological study of radicular cysts diagnosed in a Brazilian population. **Braz Dent J**, v. 22, n. 6, p. 449-54, 2011.

SOLUK TEKKEŞİN, M.; MUTLU, S.; OLGAÇ, V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. **Turk Patoloji Derg**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2012.

SUNDBLAD, V. et al. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. **J Immunol**, v. 199, n. 11, p. 3721-30, Dec 2017.

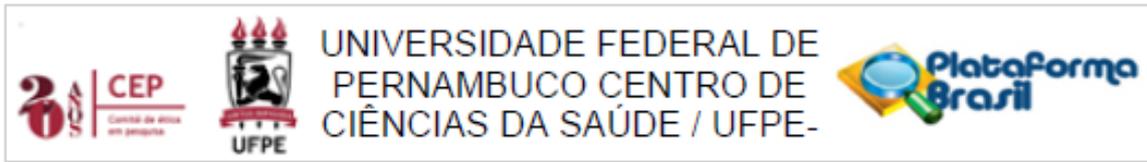
SUZUKI, T. et al. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n.1, p. 46-52, 2005.

TAVARES, D.P et al. Clinical and radiological analysis of a series of periapical cysts and periapical granulomas diagnosed in a Brazilian population. **J Clin Exp Dent**, v. 9, n. 1, p. e129-e135, Jan 2017.

YASEEN, H. Galectin-1 Facilitates Macrophage Reprogramming and Resolution of Inflammation Through IFN- β . **Front Pharmacol**, v. 11, n. 11, p. 901–, 2020.

ZHANG, J. et al. Galectin-1 Inhibited LPS-Induced Autophagy and Apoptosis of Human Periodontal Ligament Stem Cells. **Inflammation**, Feb 2021.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA GALECTINA -1 NA VIA APOPTÓTICA (BAX, BCL-2, CASPASE-3 E DR-5) EM GRANULOMAS PERIAPICAIIS, CISTOS RADICULARES E CISTOS RADICULARES RESIDUAIS

Pesquisador: Lívia Natália Sales Brito

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89152818.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.754.067

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa que tem a finalidade de ser a Tese de doutorado de Lívia Natália Sales Brito, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, que tem como orientador o Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy, Coorientador o Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka. Os pesquisadores buscarão investigar da participação das moléculas Bax, Bcl-2, caspase -3, DR5 e galectina -1 no desenvolvimento das lesões periapicais, uma vez que os mecanismos da sua patogênese ainda não foram completamente elucidados.

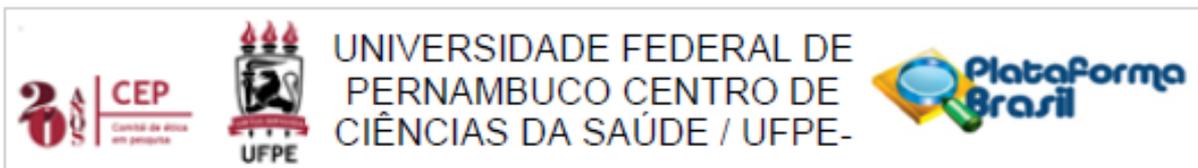
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Avaliar a expressão imunoistoquímica do Bax, Bcl-2, caspase-3, DR5, e galectina -1 em Granuloma periapical (GP), Cisto Radicular (CR) e Cisto Radicular Residual (CRR), correlacionando-as a intensidade do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo das lesões referidas, e o padrão do revestimento epitelial nas lesões císticas.

Objetivos Específicos:

- Avaliar possíveis diferenças na imunoexpressão de cada marcador imunoistoquímico com a intensidade do infiltrado inflamatório em GP, CR e CRR e com o padrão do revestimento epitelial nas lesões císticas, Correlacionando a expressão de cada marcador imunoistoquímico com o tipo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2128-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.754.067

de lesão. Assim como, correlacionar a expressão de cada marcador imunistoquímico com o local de expressão, no compartimento celular (nuclear ou citoplasmático) e no compartimento tecidual (epitelial ou conjuntivo).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão adequados para a pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

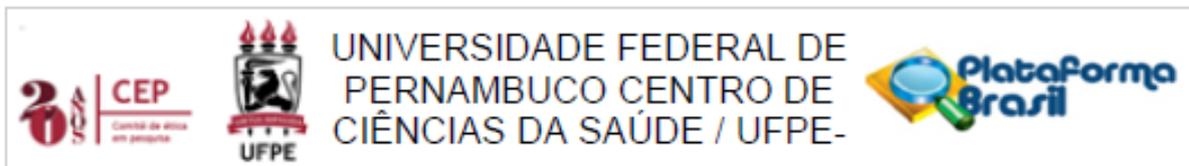
O estudo terá caráter observacional, descritivo e retrospectivo. Será utilizado uma amostra não-probabilista por conveniência, a amostra do presente estudo será constituída por todos os casos de CR, GP e CRR diagnosticados e registrados no Laboratório de Patologia Oral da UFPE, do período de janeiro de 1999 até março de 2019. Serão selecionados 90 espécimes que terão sido, anteriormente, fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina. Destes, 30 casos terão sido diagnosticados como GP, 30 como CR e 30 como CRR. Estes serão avaliados os aspectos histomorfológicos dos casos selecionados nos aumentos de 40x, 100x e 400x, por dois examinadores previamente calibrados por análise de concordância inter e intra examinador (Kappa),itrado inflamatório. Depois as amostras serão submetidas a análise imunohistoquímica para a análise das moléculas. A análise da expressão imunistoquímica do Bax, Bcl-2, caspase-3 e DR-5 e em GP, CR e CRR será fundamentada na positividade da marcação, sendo consideradas positivas todas as células (inflamatórias e epiteliais) que apresentarem pigmentos de coloração acastanhada no citoplasma celular. Já para a galectina-1, serão consideradas positivas as células inflamatórias e epiteliais que apresentarem coloração acastanhada na porção nuclear e/ou citoplasmática.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável anexou os seguintes documentos conforme solicita a resolução n°466/12:

- 1- Carta de anuência para a utilização do Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);
- 2- Folha de rosto devidamente assinada e carimbada;
- 3- Currículo lattes dos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento do projeto;
- 5- Termo de compromisso e confidencialidade;
- 6- O orçamento e cronogramas estão adequados a proposta;
- 7- Autorização de uso de dados;
- 8- Anexou o projeto formato world;

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.754.067

9- Anexou o documento de vínculo com o doutorado.

Recomendações:

Não Há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador responsável atendeu aos requisitos éticos necessários para a realização de pesquisa com seres humanos, obedecendo a resolução N°466/12, e o projeto poderá ser iniciado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

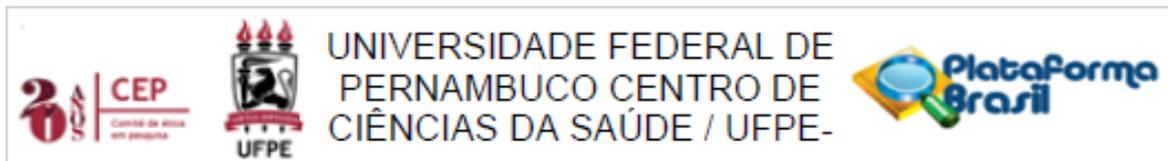
Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS N° 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. da Engenharia s/n° - 1° andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.754.067

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1102405.pdf	08/05/2018 10:11:48		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetedetalhado.pdf	07/05/2018 22:19:29	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	07/05/2018 22:18:49	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	lattespesquisador.pdf	06/05/2018 12:50:49	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	declaracaodevinculodocurso.pdf	06/05/2018 12:49:51	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	termodecompromissodopesquisador.pdf	06/05/2018 12:48:28	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	declaracaodeautorizacaodeusodedados.pdf	06/05/2018 12:47:16	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	CartaAnuencia.pdf	06/05/2018 12:46:07	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	lattescoorientador.pdf	06/05/2018 12:43:18	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Outros	lattesorientador.pdf	06/05/2018 12:40:32	Lívia Natália Sales Brito	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	06/05/2018 12:17:10	Lívia Natália Sales Brito	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 04 de Julho de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br