

UNIVERSIDADE DE UBERABA
RITA DE CÁSSIA MEDEIROS DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO *IN SITU* DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR 2 e 4)
E GALECTINAS (GAL 3 e 9) NAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS
HUMANAS COMPARADOS COM TECIDOS CONTROLES.**

UBERABA – MG

2013

RITA DE CÁSSIA MEDEIROS DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO *IN SITU* DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR 2 e 4)
E GALECTINAS (GAL 3 e 9) NAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS
HUMANAS COMPARADOS COM TECIDOS CONTROLES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Bertulucci
Rocha Rodrigues

UBERABA – MG

2013

RESUMO

Introdução: os cistos radiculares e granulomas periapicais são mediados por uma combinação de moléculas inflamatórias que se desenvolvem de modo a prevenir a infecção periapical em resposta de espécies microbiana no canal dentário. Sabe-se que o reconhecimento dos patógenos é feito por moléculas do tipo TLRs e que as galectinas são lecitinas que podem ser associadas com o processo inflamatório, estimulando ou inibindo o sistema imunitário. **Objetivo:** avalia a expressão in situ de receptores Toll-like (TLR-2 e TLR-4) e de galectinas (Gal-3 e Gal-9) em cistos radiculares e granulomas periapicais em comparação com o grupo controle negativo. **Método:** Foram analisados 62 casos (30 cistos radiculares, 27 granulomas periapicais e cinco casos do controle negativo). Foi utilizada a imunohistoquímica indireta para avaliar a expressão de TLRs (TLR-2 e TLR-4) e galectinas (Gal-3 e Gal-9). **Resultados:** a expressão de Gal-3 e Gal-9 foi significativamente maior nos granulomas periapicais e cistos radiculares comparados ao grupo controle. Do mesmo modo, tanto Gal-3 e Gal-9 foram significativamente mais expressos em granulomas periapicais do que em cistos radiculares. A expressão de TLR-2 foi significativamente maior nos granulomas apicais e cistos radiculares do que do que no grupo controle, e também foi significativamente maior em cistos radiculares com fístulas do que nos casos sem fístula. Além disso, a expressão de TLR-4 foi significativamente mais elevada nos casos de granulomas periapicais com fístulas que nos casos sem fístulas. **Conclusão:** acreditamos que a expressão da Gal-9 pode modular a resposta inflamatória nestas lesões periapicais não reagudizadas, enquanto Gal-3 pode estar associada com a reagudização da resposta inflamatória, ativando assim as vias de TLR.

Palavras - chave: galectinas, TLR, cistos radiculares e granulomas periapicais.

ABSTRACT

Introduction: Cysts and periapical granulomas are mediated by a combination of inflammatory molecules that develop in order to prevent periapical infection in response to microbial species in dental root canal. It is known that TLRs are pathogen recognition molecules and that galectins are lectins which can be associated with the inflammatory process, stimulating or inhibiting the immune system. **Objective:** To evaluate the *in situ* expression of Toll-like receptors (TRL-2 and TLR-4) and of galectins (Gal-3 and Gal-9) in radicular cysts and periapical granulomas in comparison with the control group. **Methods:** we analyzed 62 cases (30 radicular cysts, 27 periapical granulomas, and five control cases). Indirect immunohistochemistry was used to evaluate the expression of TLRs (TRL-2 and TLR-4) and galectins (Gal-3 and Gal-9). **Results:** The expression of Gal-3 and Gal-9 was significantly higher in periapical granulomas and radicular cysts than in the control group. Similarly, both Gal-3 and Gal- 9 were significantly more expressed in periapical granulomas than in radicular cysts. The expression of TLR-2 was significantly higher in periapical granulomas and radicular cysts than in the control group, and it was also significantly higher in radicular cysts with fistula than in the cases without fistula. Furthermore, the expression of TLR- 4 was significantly higher in the cases of periapical granulomas with fistula than in the cases without fistula. **Conclusion:** We believe that Gal-9 expression may modulate the inflammatory response in these non-re-exacerbated chronic periapical lesions, whereas Gal-3 may be associated with the re-exarcebation of the inflammatory response, thus activating TLR pathways.

Keywords: Galectins, TLR, radicular cysts and periapical granulomas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Distribuição do número de células positivas para TLR-2 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais). A linha horizontal representa a mediana, a barra de dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Kruskall Wallis; $p < 0,001$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 28

Gráfico 2 - Distribuição do número de células positivas para TLR-2 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístulas). A linha horizontal representa a mediana, a barra de dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p = 0,039$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 29

Gráfico 3 - Distribuição do número de células positivas para TLR-2 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado MN e MN/PMN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p = 0,283$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 30

Gráfico 4 - Distribuição do número de células positivas para TLR-4 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 31

Gráfico 5 - Distribuição do número de células positivas para TLR-4 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístula). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p = 0,016$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 32

Gráfico 6 - Distribuição do número de células positivas para TLR-4 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado inflamatório MN e MN/PMN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 33

Gráfico 07 - Distribuição do número de células positivas para Gal-3 e Gal-9 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais) e grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Kruskal-Wallis; $p = 0,009$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 34.

Gráfico 8 - Distribuição do número de células positivas para Gal-3 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístulas). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 35

Gráfico 8 - Distribuição do número de células positivas para Gal-3 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístulas). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 36

Gráfico 10 - Distribuição do número de células positivas para Gal-3 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado inflamatório MN e PMN/MN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. * (Mann-Whitney; $p > 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 37

Gráfico 11 - Distribuição do número de células positivas para Gal-9 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado MN e MN/PMN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 38

Gráfico 11 - Distribuição do número de células positivas para Gal-9 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado MN e MN/PMN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Página: 39

Prancha 1: Imunomarcção para TLR-4 em lesões periapicais: (A) TLR-4 em cisto radicular – 40X e (B): TLR-4 em granuloma periapical – 40X. Fonte: Dados da pesquisa. 2012. Página: 39

Prancha 2: Imunomarcção para TLR-2 em lesões periapicais: (C) TLR-2 em cisto radicular – 40X e (D): TLR-2 em granuloma periapical – 40X. Fonte: Dados da pesquisa. 2012. Página: 39

Prancha 3: Imunomarcção para Gal-3 em lesões periapicais: (E) Gal-3 em cisto radicular – 40X e (F): Gal-3 em granuloma periapical – 40X. Fonte: Dados da pesquisa. 2012. Página: 40.

Prancha 4: Imunomarcção para Gal-9 em lesões periapicais: (G) Gal-9 em cisto radicular – 40X e (H): Gal-3 em granuloma periapical – 40X. Fonte: Dados da pesquisa. 2012. Página: 40.

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Distribuição do tipo de infiltrado inflamatório polimorfonucleares/mononucleares e mononucleares e a ausência ou presença de fístulas encontradas nos 57 casos com lesões estudados. Página: 27.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CDR:** Domínio de reconhecimento de carboidratos
- DC:** Células dendríticas
- DMSCs:** Derivados Mielóides supressores de células
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- Gal:** Galectinas
- IFN:** Interferon
- IFN α :** Interferon α
- IgE:** Imunoglobulinas E
- IL-12:** Interleucina – 12
- LES:** Lúpus eritematoso
- LPS:** Lipossacarídeo
- MyD88:** Fator de diferenciação mielóide
- NF-KB:** Fator nuclear Kapp B
- NO:** Óxido nítrico
- PAMP:** Padrões moleculares associados à patógenos
- PBS:** Phosphate buffered saline
- PBS-BSA:** Phosphate buffered saline - Bovine Serum Albumin
- PMN:** Polimorfonucleares
- PRR:** Receptor de reconhecimento padrão
- RE:** Retículo endoplasmático
- RNA:** Ácido ribonucléico
- SNC:** Sistema nervoso central
- TIM-3:** Mucina imunoglobulina de célula T3
- TIR:** Toll terminal-C/IL-1R
- TLR:** Receptor tipo Toll
- TNF- α :** Fator de necrose tumoral alfa
- VDR:** Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Lesões periapicais.....	9
1.2	Cistos radiculares e granulomas periapicais.....	10
1.3	Citocinas	12
1.3.1	Receptores tipo Toll.....	12
1.3.2	Galectinas.....	14
1.3.3	Hipótese.....	20
1.4	Objetivos.....	21
1.4.1	Objetivo geral.....	21
1.4.2	Objetivos específicos.....	21
2.	MATERIAIS E METODO.....	22
2.1	Casuística.....	22
2.2	Obtenção da amostra.....	23
2.3	Imunohistoquímica para receptores do tipo Toll 2 e 4.....	23
2.4	Imunohistoquímica para detecção de Gal 3 e 9.....	25
2.5	Captura das imagens.....	26
2.6	Análise estatística.....	26
3.	RESULTADOS.....	27
4.	DISCUSSÃO.....	41
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
6.	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesões periapicais

O termo lesão periapical geralmente é utilizado para identificar lesões inflamatórias crônicas nos tecidos que circundam e se relacionam diretamente com o ápice dentário. O granuloma periapical e o cisto radicular estão entre as principais lesões periapicais (CONSOLARO, 2008).

Frente a uma agressão a resposta imunológica primária tem início a nível vascular com a vasoconstrição rápida, quase imediatamente seguida por vasodilatação, originando um acúmulo de células vermelhas do sangue no centro do vaso, e uma migração de leucócitos para as zonas periféricas, que adere às paredes vasculares. Isto provoca a formação de pequenas fissuras no endotélio do vaso, induzindo um extravasamento de plasma para o tecido conjuntivo; já o edema é produzido devido ao aumento da pressão local e compressão das terminações nervosas, causando a dor. A consequência final do processo inflamatório é um infiltrado contendo linfócitos, macrófagos e células plasmáticas (LOPEZ, 2004).

Na fase aguda da inflamação, um exsudado é produzido como resposta à agressão do tecido da polpa e da lesão periapical, predominando neutrófilos polimorfonucleares. Uma vez que a inflamação atingiu a fase crônica, o hospedeiro responde com a proliferação de novas células, vasos e fibras para tentar reparar a lesão, o que resulta na formação de um novo tecido chamado de tecido de granulação (LOPEZ, 2004).

A infecção bacteriana da polpa dental é a principal etiologia de lesões periapicais. Em geral, estas lesões são diagnosticadas ou durante o exame de rotina dental radiográfico ou na sequência de dor aguda e/ou edema relacionado ao dente afetado (JAYALAKSHMI, et al., 2012).

O papel dos microrganismos no desenvolvimento de doenças periapicais tem sido claramente demonstrado em modelos animais e estudos humanos. O desenvolvimento e progressão da lesão endodôntica está associada com a presença de microrganismos no sistema de canais radiculares. A infecção do sistema de canais perirradiculares é geralmente polimicrobiana, composta por bactérias anaeróbias e aeróbias da microbiota normal da cavidade oral (VIJAYARAGHAVAN, et al., 2012).

As lesões periapicais são consideradas, portanto, como uma resposta do hospedeiro, que envolve reação imunológica, para prevenir a disseminação de bactérias a partir de um canal radicular infectado (YANAGISAWA, 1980; TERONEN et al., 1996, SALUM et al., 2010). Tais lesões ocorrem, portanto como resultado da ativação e interação das respostas imunes do hospedeiro contra a infecção do canal radicular (MARCATO et al., 2008); e estão entre as patologias que ocorrem com maior frequência no osso alveolar (LIAPATAS et al., 2003; RICUCCI et al., 2006).

A maioria das lesões periapicais (> 90%) pode ser classificada como: granulomas periapicais, abscessos ou cistos radiculares. A incidência de cistos radiculares varia entre 6 e 55% e a ocorrência de granulomas periapicais varia entre 9,3 e 87,1% (JAYALAKSHMI, et al., 2012).

1.2 Cistos radiculares e granulomas periapicais

Os cistos radiculares e os granulomas periapicais são considerados lesões crônicas que são controladas por um conjunto de mediadores inflamatórios que se desenvolvem a fim de conter a infecção periapical (STASHENKO, 1990; NAIR, 1997; MARÇAL et al., 2010).

Do granuloma periapical deriva o cisto radicular a partir da proliferação dos restos epiteliais de Malassez normalmente encontrados no ligamento periodontal (CONSOLARO, 2008).

O granuloma periapical constitui-se em uma inflamação com destruição do tecido periapical causada por agentes responsáveis pela infecção pulpar, quando a infecção atinge o periápice o hospedeiro libera mecanismos de defesa (células, anticorpos, mensageiros intracelulares) (LIAPATAS et al., 2003; HAMA et al., 2006).

O granuloma periapical é considerado a origem da formação do cisto radicular, que é uma lesão periapical que resulta em uma destruição óssea do maxilar (ORLANDINI et al., 1996; LIAPATAS et al., 2003; HREN et al., 2009). É uma massa localizada de tecido inflamatório crônico, com infiltrado inflamatório que pode sofrer reagudização (RAMACHANDRAN et al., 1996), contendo um grande número de monócitos/macrófagos, linfócitos T, e um pequeno número de linfócitos B e leucócitos polimorfonucleares (RAMACHANDRAN et al., 1996; KABASHIMA et al., 1998).

Quando a infecção pulpar se espalha para o periápice, uma resposta inflamatória sintomática do tecido conjuntivo periapical é produzida sob a forma de um abscesso ou lesão aguda (RAMACHANDRAN et al., 1996). A lesão contém um acúmulo denso de leucócitos polimorfonucleares (PMN), que são revestidos por tecido granulomatoso contendo linfócitos, macrófagos e células plasmáticas (RAMACHANDRAN et al., 1996).

Os cistos radiculares derivam de restos epiteliais envolvidos durante a evolução dos granulomas periapicais, que podem estar associados à formação da cavidade central e limitados por epitélio escamoso estratificado, que pode ser descontínuo (SHEAR, 1999). É uma lesão inflamatória crônica, com uma cavidade patológica fechada (NOBUHARA & DEL RIO, 1993; RAMACHANDRAN et al., 1996; VIER & FIGUEIREDO, 2002; VIER & FIGUEIREDO, 2004). As lesões menores não são distinguíveis clinicamente e radiograficamente. A radiolucidez de tamanho variável pode ser observada com perda da lâmina dura periapical, com fronteiras bem ou mal definidas, com ou sem envolvimento da condensação óssea (LIA, 2002; SHEAR, 1999; TROPE et al., 1989). O cisto radicular é o cisto mais encontrado na mandíbula (NAIR, 2003).

A etiopatogênia do cisto radicular é particularmente controversa, são diversas teorias, uma delas é baseada na formação de um trato epitelizado fistuloso até o granuloma a partir de um abscesso periapical fistulizado para a cavidade oral originando um cisto radicular. Outra teoria é a da cavitação epitelial; são acumuladas células epiteliais que ficam afastadas do tecido conjuntivo e acabam ficando sem vascularização sendo submetidas à degeneração e necrose; já a teoria da formação de microabscessos baseia-se na degeneração do tecido conjuntivo conduzindo ao desenvolvimento do cisto (GAY, 1999). Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos etiopatogênicos exatos dos cistos radiculares (RICUCCI & BERGENHOLTZ, 2004).

1.3 Citocinas

1.3.1 Receptores tipo Toll

Os receptores do tipo Toll (TLR) são moléculas envolvidas nas reações imunológicas e descritas como uma família de receptores de reconhecimento padrão, que alertam o hospedeiro da presença de um patógeno invasor (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; DASARI et al., 2010); são receptores de transdução de sinais, que iniciam a cascata inflamatória (BEUTLER et al., 2003).

Foram observados a partir de *Drosophilas*, e são expressos em células imunes inatas, sendo os sensores chaves para um amplo espectro de agentes patológicos, moldando as interações patógenos hospedeiro (ADEREM & ULEVITCH, 2000).

Mais de 10 membros da família TLR foram relatados em mamíferos e funcionam como Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR), reconhecendo uma variedade de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP), tais como lipopolissacarídeos, lipoproteína, ácidos nucleicos, entre outros (AKIRA et al., 2006).

A ativação do TLR leva não somente a indução da resposta inflamatória, mas, também ao desenvolvimento do antígeno específico da imunidade adaptativa (HASHIMOTO et al., 1988; TAKEDA et al., 2003).

Há relatos que TLR induz aumento da regulação do receptor de vitamina D (VDR), 1alfa vitamina D hidroxilase (enzima que converte vitamina D de inativo para ativo) e a expressão do gene CYP27B1 em monócitos e macrófagos (LIU et al., 2006).

A família TLR pode ser dividida em grande parte extracelular e intracelular, TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11 são localizados na superfície da célula para reconhecer PAMP; já TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 são intracelulares, e expressam compartimentos endossomais e lisossômicos, ao retículo endoplasmático (ER) (YAMAMOTO & TAKEDA, 2010). Os intracelulares são localizados na membrana do ER em células em repouso, porém, quando estimuladas, são traficadas para o compartimento endossomal (LATZ et al., 2004; NISHIYA et al., 2005).

A integridade da estrutura do componente de sinalização TLR é essencial para a proteção imunológica a partir da infecção, mudanças estruturais são frequentemente

associadas com a maior susceptibilidade para doenças infecciosas (LIU et al., 2006). A ativação de TLRs desencadeia uma série complexa de acontecimentos que culminam em uma reforçada transcrição de genes pro-inflamatórios, cuja meta é iniciar os mecanismos que neutralizam a infecção (AN et al., 2002).

Cada TLR é um tipo de proteína de membrana, a qual mediante ativação resulta em recrutamento do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que é uma proteína adaptadora que interage com TLR através do seu próprio Toll terminal-C/IL-1R domínio (AKIRA et al., 2006; KAWAI & AKIRA, 2007.)

O TLR-2 desempenha um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra bactérias Gram positivas e seus componentes celulares (MATSUGUSHI et al., 2003; KOMORI et al., 2010), inclusive em neonatais (ZHANG et al., 2010). E contribui para a produção de citocinas inflamatórias e interferon tipo 1 (IFN tipo 1), assim como para o controle da carga viral (ZHANG et al., 2010). A via TLR-2 tem papel relevante no reconhecimento do vírus e na ativação da resposta imune inata (TOSHCHAKOV et al., 2002; MICHAUD et al., 2010). Os TLR-2 reconhecem um grande número de moléculas que contem lipídios e traduzem com um sinal inflamatório para vários tipos de células (AKIRA et al., 2006; KUO et al., 2010). Estes receptores são necessários para a expansão de células T efectoras que induzem a secreção de interferon-gama (IFN- γ) (HELDWEIN et al., 2003).

O polimorfismo do gene TLR-2 apresentou-se com características deletérias, podendo ser associado com a mortalidade na sepse, e também com elevada prevalência de infecções provocadas por bactérias Gram positivas em participantes com sepse (SUTHERLAND et al., 2005; VERSTAK et al., 2007). O TLR-2 é uma molécula essencial para que os macrófagos reconheçam *Staphylococcus aureus*, e para estabelecer proteção da resposta imune contra infecções de bactérias Gram positivas (ECHCHANNAOUI et al., 2002; TAKEUCHI et al., 2000; TAKEUCHI et al., 1999; UNDERHILL et al., 1999).

O TLR-2 também apresenta grande importância na indução da resposta imunológica antibacteriana no parênquima no sistema nervoso central (SNC) para o abscesso cerebral, possuindo um papel central durante a fase aguda (KIELIAN et al., 2001; KIELIAN et al., 2004). É importante para regular a indução da expressão de algumas moléculas no abscesso cerebral agudo, mostrando que é necessário para modular a expressão de PRRs adicionais, como o CD14, que pode funcionar em conjunto em um complexo multirreceptor para maximizar o reconhecimento do patógeno no SNC. (DZIARSKI, 2003; SCHWANDNER et al., 1999; YOSHMURA et al., 1999).

O TLR-4 pode reconhecer o lipossacarídeo bacteriano (LPS), que se encontra na parede celular das bactérias Gram negativas (HOSHINO et al., 1999; YANG et al., 1999; PELEDAN et al., 2001.), para assim induzir a produção de citocinas, entre elas TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IFN- β (interferon beta), e interleucina 1 β (METHE et al., 2005). TLR-4 ainda pode ser necessário para o desenvolvimento da resposta Th1 normal (HELDWEIN et al., 2003), e quando ativada, induz a expressão de algumas citocinas que estão associadas à reabsorção óssea e a ruptura do tecido em lesões endodônticas periapicais (HOU et al., 2000; MURAKAMI et al., 2001). Há expressão de TLR-4 em macrófagos de ratos tolerantes à LPS e existe uma correlação entre a redução da expressão de TLR-4 e a queda na produção de IL-6, o que indica uma modulação ao nível da membrana celular (METHE et al., 2005).

A colaboração entre TLR-2 e TLR-4 pode ser crucial para mecanismos de transcrição da imunidade inata à adaptativa em animais infectados (LAFLAMME et al., 2003).

1.3.2 Galectinas

As galectinas (Gal) são moléculas com ação no sistema imunológico; são consideradas lectinas endógenas e na atualidade tem sido dada ênfase a estudos que investigam as suas propriedades. As Gal são proteínas que participam de diferentes fenômenos biológicos, como interação célula-célula e célula matriz extracelular, diferenciação celular, angiogênese e apoptose (LEFFLER et al., 2004; BARONDES et al., 1994).

Embora todas compartilhem uma sequência de núcleo no seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), elas exibem diferenças estruturais interessantes na apresentação do domínio de reconhecimento de carboidratos (LIU, 1990).

Os membros da família de proteínas galectina são classificados pela sua capacidade de ligar-se à beta-galactosídeos e por uma sequência de aproximadamente 130 aminoácidos dentro de seu domínio de reconhecimento de carboidratos (BARONDES et al., 1994).

As Gal também podem vincular seus ligantes em uma forma de hidratos de carbono independentes. Este é frequentemente o caso no meio intracelular, onde a ligação ocorre predominantemente através de interações proteína-proteína (LIU et al., 2002). Além das estruturas glicano básicas que são geralmente reconhecidas por Gal, cada membro da família

Gal liga-se preferencialmente a um conjunto seletivo de proteínas glicosiladas e/ou lipídios que podem estar localizados na célula, na superfície da célula ou na matriz extracelular. As Gal podem formar complexos proteína-proteína independente das interações do CRD glicoconjugados (MATSUURA et al., 2009).

Os membros da família Gal estão estruturalmente classificados em três grupos. Gal-1, 2, 7, 10 e 13 são protótipos de Gal, enquanto que a Gal-3 é um tipo de quimera. Já as Gal-4, 8, 9 e 12 pertencem ao tipo de subfamília que se repetem, o qual é caracterizado estruturalmente pela presença de dois reconhecimentos de hidrato de carbono de domínios distintos, com especificidades diferentes de ligação de açúcar que se juntaram por um peptídeo ligante. Consequentemente, os membros da família das Gal têm um amplo espectro potencial de células-alvo e funções biológicas e, dependendo da localização celular do respectivo parceiro de ligação, a atividade de uma Gal membro da família pode ser oposto (MATSUURA et al., 2009).

As Gal têm sido isoladas a partir de um número de espécies variando de vertebrados a esponjas, sugerindo que elas desempenham papéis essenciais na função celular básica (COOPER & BARONDES, 1999; HOUZELSTEIN et al., 2004). As Gal desempenham um papel significativo na promoção do crescimento e ativação de fibroblastos nos tecidos (HENDERSON & SETHI, 2009). Sua importância se deve o fato de que distintos tecidos ou células de organismos diferentes podem expressar essas proteínas e seus homólogos (RUBINSTEIN et al., 2004).

As Gal são expressas em todos os tipos de células do sistema imune, incluindo células endoteliais, linfócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos e em células dendríticas (DC), provocando a ativação pró-inflamatória de leucócitos (NORLING; PERRETTI; COOPER, 2009; RABINOVICH et al., 2002). Uma grande variedade de funções biológicas envolvidas nas respostas imune e inflamatória e desenvolvimento de tumores foram relatadas para Gal na última década, incluindo papéis na adesão, migração e sobrevivência (ELOLA et al., 2007; YANG et al., 2008). Também estão envolvidas em muitos processos durante a resposta inflamatória na fase aguda, incluindo a ativação e adesão de neutrófilos, quimiotaxia de macrófagos, opsonização de neutrófilos apoptóticos e ativação de mastócitos (KUWABARA; LIU, 1996; SANO et al., 2000; KARLSSON et al., 2009; FRIGERI et al., 1993).

A Gal-3 é expressa por todos os tipos de células imunitárias, incluindo células endoteliais, linfócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos e células dendríticas (LOTAN et al., 1994., BAUM et al., 1995; TROUNG et al., 1993; LIU et al., 1995; CRAIG et

al., 1995; FLOTTE et al., 1983). Ela é altamente expressa e secretada pelos macrófagos (LIU et al., 1995); e correlaciona-se com o início de extravasamento de neutrófilos no espaço alveolar (SATO et al., 2002).

Outras funções importantes da Gal-3 são: atuação como molécula anti-apoptótica, estimuladora da angiogênese, reguladora da proliferação celular e promotora da adesão célula-célula (INOHARA et al., 1998; KIM et al., 1999; NANGIA-MAKKER et al., 2000; LEE et al., 2006; HOYER et al., 2004). Pode regular a resposta inflamatória através de suas funções na ativação e migração celular e regulação da apoptose em células do sistema imunológico (LIU & RABINOVICH, 2005). No entanto, a função de Gal ao nível molecular é multifacetada. É também considerada uma molécula epícena, encontrada nos tecidos extracelulares, compartimentos citoplasmáticos e nucleares, e tem uma habilidade dependente da concentração a ser monomérica ou formar oligômeros. Estas propriedades conferem grande flexibilidade a ela como um regulador preciso de muitos sistemas biológicos. Sua forma monomérica dá uma grande flexibilidade na Gal-3 como um regulador específico de muitos sistemas biológicos (HENDERSON & SETHI, 2009).

A Gal-3 também está envolvida na apoptose quando está intracelular (YANG; HSU; LIU, 1996), enquanto extracelularmente ela também induz apoptose de células T (FUKUMORI et al., 2003). Sua expressão é aumentada quando os monócitos se diferenciam em macrófagos (LIU et al., 1995) e diminuída quando as células dendríticas imaturas diferenciam-se em células dendríticas maduras (DIETZ et al., 2000).

A Gal-3 promove interações monócitos-monócitos que levam a formação de células gigantes multinucleadas, e sua expressão tem sido associada a malignidade estando aumentada em tumores (INOHARA et al., 2008; SAUSSEZ et al., 2008). Podem ser de utilização como um marcador para a determinação de fases de certos tumores (BALASUBRAMANIAN et al., 2008; MATSUDA et al., 2008).

A modulação de expressão e interação da Gal-3 com CD98/integrinas durante a diferenciação de macrófagos pode representar importantes passos na regulação da plasticidade dos macrófagos e controle na formação da inflamação crônica. A variação da sua função nos diferentes modelos de doenças podem refletir a função dualista dos macrófagos. A manipulação da sua atividade tem efeitos profundos sobre a inflamação. Por exemplo, na lesão tecidual aguda e inflamação ela é uma componente chave na defesa do hospedeiro contra os micróbios, como *S. pneumoniae*. No entanto, se o estímulo inicial torna-se repetitivo, a Gal-3 também parece estar intimamente envolvida na transição para a inflamação crônica (HENDERSON & SETHI, 2009).

Durante a inflamação a Gal-3 é liberada no espaço extracelular onde ativam células inflamatórias ou contribuem para sua retenção, aumentando as interações celulares com glicoproteínas da matriz extracelular (FRIGERI et al., 1993; SUZUKI et al., 2008). De acordo com um papel pró-inflamatório, a Gal-3 exógena tem sido demonstrada para ativar numerosos tipos celulares envolvidos na resposta imune inflamatória, ou seja, induzir degranulação dos mastócitos (FRIGERI et al., 1993; SUZUKI et al., 2008). Ela mostra-se expressa em cultivos primários de mastócitos, mastócitos do tecido e linhagens de mastócitos (FRIGERI & LIU, 1992; LIU et al., 1993) e localizadas no citoplasma e no núcleo destas células (CRAIG et al., 1995).

Uma fonte exógena de Gal-3 foi mostrada para ativar mastócitos (FRIGERI; ZUBERI; LIU, 1993; ZUBERI; FRIGERI; LIU, 1994), mas, a sua função endógena é desconhecida. Os mastócitos são as principais células efetoras da hipersensibilidade imediata às reações (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997). A ligação de antígenos multivalentes ligados à superfície de IgE (imunoglobulinas E) provoca a agregação de alta afinidade do receptor IgE e inicia a transdução de sinal transmembranar. Isto resulta na secreção de histamina e um conjunto pré-formado ou outro recém-sintetizado de mediadores e produção de citocinas com propriedades pró-inflamatórias e imuno-regulatórias (GORDON; BURD; GALLI, 1990; SCHWARTZ, 1994).

A Gal-9 foi descrita pela primeira vez no linfoma de Hodgkin como um antigénio tumoral. Uma grande variedade de células incluindo monócitos/macrófagos expressam Gal-9. A sua expressão foi relatada para ser regulada negativamente durante a diferenciação monocítica de células HL60 (KASHIO et al., 2003).

A Gal-9 também é distribuída em certas células fundamentais para a resposta inflamatória: células endoteliais (IMAIZUMI et al., 2002), células T (MATSUMOTO et al., 1998) e fibroblastos (ASAKURA et al., 2002). Ela foi originalmente identificada como uma potente quimiotática de eosinófilos produzidos e lançados pelas células T antígeno estimuladas (MATSUMOTO et al., 1998). Além disso, também foi demonstrado que esta lectina age diretamente sobre a agregação e indução de eosinófilos e sobre a produção de superóxido, que prolonga a sobrevivência destas células (MATSUMOTO et al., 2002). Portanto, apresenta várias atividades biológicas, tais como quimiotaxia, a agregação de células, indução de produção de radicais livres e apoptose (MATSUMOTO et al., 2002; KASHIO et al., 2003). Esta molécula é um ativadora potente da maturação das células dendríticas e, portanto, um iniciador da resposta imune adaptativa (DAI et al., 2005).

Da mesma forma que a Gal-1, a Gal-9 também é conhecida por induzir a apoptose de timócitos (WADA et al., 1997) e células T periféricas, implicando um papel tanto na maturação de células T e na modulação da célula T mediada por reações imunológicas (KASHIO et al., 2003). No entanto, estas duas Gal requerem diferentes ligantes e utilizam diferentes vias intracelulares de morte a induzir a apoptose celular, devido às suas características estruturais distintas (BI et al., 2008). Gal-9 também é um fator prognóstico uma vez que apresenta propriedades antimetastática em câncer de mama (IRIE et al., 2005).

A Gal-9 também interage com diversas glicoproteínas; o melhor parceiro de ligação caracterizado é a mucina imunoglobulina de célula T3 (TIM-3), uma proteína específica presente em subconjuntos de células T e células do sistema imunológico inato, como monócitos, macrófagos e DCs (ZHU et al., 2005; FREEMAN et al., 2010). A Gal-9 tem um papel multifacetado em desenvolvimento de células T e homeostase, pois, está envolvida na seleção tímica de células T (WADA et al., 1997). Em particular, ela foi encontrada por ser altamente expressa nas células epiteliais tímicas em camundongos (WADA et al., 1997). A Gal-9 tem uma série de efeitos sobre várias populações de células T que servem para alterar o equilíbrio delas por regular negativamente Th1 e Th17 (WANG et al., 2009). O efeito mais importante do tratamento de células T com esta molécula é a indução de apoptose levando essas células à morte (KASHIO et al., 2003). Além de indução direta de morte de células T, a ela suprimiu a susceptibilidade de Células T à estimulação mitogênica (CHOU; SHIEH; SYTWU, 2009).

Reações auto-imunes são caracterizadas pela ativação de células Th1 e Th17 (DARDALHON et al., 2008). A Gal-9 recombinante pode ser de valor potencial para restringir auto-imunidade aguda e/ou crônica, como se observou em modelos pré-clínicos de várias doenças auto-imunes, onde o tratamento com este tipo de molécula provou ser benéfico (ZHU et al., 2005).

A administração de Gal-9 recombinante para camundongos com encefalomielite experimental autoimune resultou na eliminação específica de células Th1, bem como uma diminuição nos níveis circulantes do interferon gama (IFN- γ) e uma concomitante redução na severidade e mortalidade da doença (ZHU et al., 2005). A atividade semelhante foi detectada em modelos autoimunes associados à artrite e à diabetes autoimune (SEKI et al., 2008; SEKI et al., 2007; ARIKAWA et al., 2009). A atividade terapêutica da Gal-9 recombinante nestes modelos reduziu populações de células Th1 e Th17 e níveis de citocinas pró-inflamatórias (SEKI et al., 2008; ARIKAWA et al., 2009). Em contrapartida, os níveis de citocinas Th2 não

foram afetados pelo tratamento com Gal-9, sugerindo que as células Th2 não são o principal alvo de atividade apoptótica mediada por ela (SEKI et al., 2008).

A Gal-9 tem vários efeitos sobre as respostas inatas e doenças autoimunes (ARIKAWA et al., 2009). Em ratos com artrite reumatóide os níveis da IL-6 foram reduzidos nas articulações após o tratamento com a proteína recombinante da Gal-9, visto que, a IL-6 é uma citocina importante na progressão de doenças inflamatórias (SEKI et al., 2008; FOUSER et al., 2008). Em outros estudos realizados com ratos, também o tratamento da artrite autoimune induzida com Gal-9 teve atividade macrofágica reprimida (ARIKAWA et al., 2009). A produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos, tais como, TNF- α e IL-1, foi reduzida (NIMMERIAHN & RAVETCH, 2008; SAMUELSSON; TOWERS; RAVETCH, 2001). A expressão de Gal-9 humana em camundongos transgênicos resultou na diferenciação e expansão dos granulócitos imunossupressores da medula óssea (GABRILOVICH & NAGARAJ, 2009; PERANZONI et al., 2010). Esses granulócitos imunossupressores, também chamados de derivados mielóides supressores de células (DMSCs), suprimem respostas das células T imunes, eliminando as células T (GABRILOVICH & NAGARAJ, 2009; PERANZONI et al., 2010).

Os macrófagos imunossupressores podem ser expandidos através de tratamento com proteína recombinante Gal-9, como mostrado em camundongos com inflamação pulmonar experimental (ARIKAWA et al., 2010). Sua sinalização via TIM-3 está envolvida em diversas funções de regulação de autoimunidade, incluindo a eliminação direta de células T inflamatórias, deslocando macrófagos para um estado anti-inflamatório, e indução de DMSCs inibitória (ZHU et al., 2005).

1.3.3. Hipótese

Nos cistos radiculares e nos granulomas periapicais há uma maior expressão dos receptores do tipo *Toll* (TLR-2 e 4) e galectinas (Gal-3 e 9) quando comparados a tecidos sem processos inflamatórios.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão *in situ* dos receptores do tipo Toll (TRL-2 e TLR-4) e galectinas (Gal-3 e Gal-9) em cistos radiculares e granulomas periapicais comparados com tecido controle negativo.

1.4.2 Objetivos específicos

- Comparar a expressão *in situ* dos receptores do tipo Toll (2 e 4) entre cistos radiculares, granulomas periapicais e tecidos controles negativos.
- Comparar a expressão *in situ* das galectinas (3 e 9) entre cistos radiculares, granulomas periapicais e tecidos controles negativos.

2 Materiais e Método

2.1 Casuística

Foram utilizadas 62 amostras, sendo: 30 amostras de participantes com cisto radicular, 27 participantes com granuloma periapical e cinco participantes sem lesões periapicais que constituíram o grupo controle negativo. As lesões foram extraídas cirurgicamente.

Os critérios de inclusão para os grupos com cisto radicular e granuloma periapical foram: 1) uma ou mais lesões ósseas periapicais diagnosticadas a partir de exame clínico; 2) participante com boas condições de saúde, sem estar fazendo uso de antibioticoterapia e/ou anti-inflamatórios por no mínimo seis meses; 3) os casos clínicos apresentaram indicação de apicectomia ou extração; 4) consentimento em participar da pesquisa através da assinatura do “Termo de Consentimento”.

Os critérios de inclusão para o grupo controle negativo foram: 1) não apresentar lesões ósseas periapicais a partir do exame clínico; 2) participante com boas condições de saúde, sem estar fazendo uso de antibioticoterapia e/ou anti-inflamatórios por no mínimo seis meses; 3) necessidade de extração dentária; 4) consentimento em participar da pesquisa através da assinatura do “Termo de Consentimento”.

Este trabalho foi avaliado pelo comitê de ética da Universidade de Uberaba – UNIUBE - e aprovado sob protocolo de número: CAAE N. 0003.0.227.000-06 (Anexo I).

Os participantes foram atendidos e submetidos a cirurgias parodontais na policlínica odontológica da Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG. O diagnóstico específico de cisto radicular e granuloma periapical foi realizado por meio de exame anátomo-patológico, segundo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (KRAMER et al., 1991).

2.2 Obtenção das Amostras

Foram coletados fragmentos teciduais “frescos” de lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais) e dos participantes do grupo controle negativo.

Estes fragmentos foram fixados no formaldeído e posteriormente incluídos em parafina para obtenção de secções histológicas de aproximadamente cinco μm de espessura. Foram confeccionadas lâminas com as secções histológicas obtidas e então coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para confirmação histológica das lesões e análise da imunohistoquímica das citocinas *in situ*. Para o grupo controle negativo a coloração pela técnica HE foi empregada para confirmar a ausência de lesões. Os tecidos do grupo controle negativo também foram submetidos à análise imunohistoquímica das citocinas *in situ*.

2.3 Imunohistoquímica para receptores do tipo TLR-2 e 4

As lâminas foram desparafinizadas em quatro banhos de xilol (xilol um, dois, três e quatro), cada banho durou 10 minutos. Em seguida as lâminas foram submetidas ao processo de hidratação em banhos de álcool (álcool absoluto 1 e 2, álcool 95% e álcool 70%). Cada banho no álcool durou cinco minutos. Na sequência as lâminas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de álcool.

Para recuperação do antígeno as lâminas foram colocadas em Banho Maria a 90°C no ácido cítrico 0,01 molar e pH seis. Transcorridos 30 minutos as lâminas foram retiradas do Banho Maria para resfriamento. Elas permaneceram na solução de ácido cítrico por mais 10 minutos até baixar a temperatura.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado colocando de 100 μL a 200 μL (quantidade suficiente para cobrir toda secção histológica) de *Phosphate buffered saline - Bovine Serum Albumin* – Salina tamponada com fosfato – Albumina de Soro Bovino (PBS-BSA) 2%. As lâminas foram incubadas com esta solução durante 30 minutos.

Na sequência foi acrescentado o anticorpo primário às secções histológicas. O anticorpo primário foi obtido comercialmente e passou por um processo prévio de diluição em

PBS/BSA 2% conforme as instruções do fabricante. Os fatores de diluição empregados assim como dados do fabricante foram os seguintes:

Anticorpos	Diluição	Fabricante	Código
Anticorpo anti-TLR-2 humano - 100ug	1:200	Sigma Life Science	PRS-3135 31351002
Anticorpo anti-TLR-4 humano - 100ug	1:50	R&D	AF-1478

As lâminas com o anticorpo primário foram incubadas por duas horas em câmara úmida.

Após o processo de incubação com o anticorpo primário as lâminas foram lavadas quatro vezes com *Phosphate buffered saline* - Salina tamponada com fosfato (PBS) 1X mais Tween 20 a 0,05% por cinco minutos cada lavagem.

Após as lavagens as lâminas foram submetidas ao processo de bloqueio da peroxidase endógena por 10 minutos com a seguinte solução: peróxido de hidrogênio a 30% (4,5 mL) misturado a metanol (145 mL). Em seguida as lâminas foram lavadas novamente por quatro vezes com a solução de PBS 1X mais Tween 20 a 0,05% por cinco minutos cada lavagem.

Foi adicionado às secções histológicas o link (DAKO) por gotejamento. Gotejou-se o link amarelo (anticorpo secundário) sobre os cortes e deixou por 30 minutos. As lâminas passaram por novo processo de lavagem por quatro vezes com PBS 1X mais Tween 20 a 0,05% por cinco minutos cada lavagem. Após a secagem foi acrescentado aos cortes o link vermelho (estreptovidina mais peroxidase) por 30 minutos. Após este tempo foi efetuado novo processo de lavagem com PBS 1X mais Tween 20 a 0,05% por cinco minutos cada lavagem.

As secções histológicas foram reveladas com a solução reveladora DAB (Diamino Benzidina). Esta solução consiste em uma mistura de um mL de tampão Tris-HCl (pH 7,2) mais um comprimido de DAB e cinco µL de peróxido de oxigênio. Gotejou-se uma gota da solução reveladora sobre as secções histológicas. As lâminas ficaram de cinco a 10 minutos com esta solução e protegidas da luz (no escuro).

Estas lâminas foram lavadas em seguida com água corrente, coradas com hematoxilina e montadas com entelan.

2.4 Imunohistoquímica para detecção de Gal-3 e Gal-9

As lâminas foram desparafinizadas em quatro banhos de xilol cada um por 10 minutos, logo em seguida passadas em 2 banhos de álcool absoluto, 1 banho de álcool 95% e 1 banho de álcool 70% durante 5 minutos cada lavagem, para a retirada do excesso de xilol e hidratação, e depois mergulhadas uma vez em tampão PBS por 5 minutos para remoção do excesso de álcool. Depois da lavagem com PBS, foi realizada a recuperação de antígeno em estufa à 90°C por 30 minutos.

Para fazer o bloqueio de ligações inespecíficas, foi adicionada em cada corte uma quantidade de 100 a 200µl de solução PBS-BSA 2% e incubados por 30 minutos. Logo após, o anticorpo primário foi diluído em solução PBS-BSA 2%, de acordo com as especificações da Gal-3 e da Gal-9, e incubados por duas horas.

Anticorpos	Diluição	Fabricante	Código
Anticorpo anti-Gal-3 humano - 100ug	1:75	R&D	AF-1154
Anticorpo anti-Gal-9 humano - 100ug	1:75	R&D	AF-2045

Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente em solução com PBS 5 minutos cada lavada e realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol com água oxigenada a 3% por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas no tampão PBS (1X) + Tween 20 a 0,05%.

Foi colocado sobre cada corte o anticorpo secundário composto pelo kit (Dako Cytomation) de Biotinylated Link Universal e Streptavidin-HRP durante 30 minutos cada, logo após, as lâminas foram lavadas 4 vezes em PBS (1X) + Tween 20 a 0,05%.

Para fazer a revelação das citocinas, foi utilizado o DAB- 3.3' Diaminobenzidina diluído em 5 ml de solução tampão TRIS-HCL (pH=7.2) e 25µl de água oxigenada (H₂O₂), deixando incubado no escuro por 2 minutos.

Estas lâminas foram lavadas em seguida com água corrente, coradas com hematoxilina e montadas com entelan.

A análise morfológica das células positivas que expressaram cada um dos receptores testados foi realizada de forma quantitativa.

2.5 Captura das Imagens

A avaliação morfométrica foi realizada a partir da quantificação do número de células marcadas com positividade específica na imunohistoquímica. Esta análise foi realizada, a partir, das imagens dos cortes histológicos que foram capturados por um sistema digital e analisados através do software “Image J” (National Institutes of Health, USA). Dessa forma, cada campo a ser quantificado foi capturado por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização da imagem. As análises morfológicas e marcações foram feitas por um único examinador calibrado e as cegas. O número de células de cada campo foi determinado, assim como, a área de cada campo (0,091575706 μm^2). A densidade de células positivas foi expressa pelo número de células por mm^2 .

$$d = \frac{\text{Número células positivas}}{\text{Área} \times \text{n}^\circ \text{ campos}}$$

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados pelo aplicativo Statview. Após análise de normalidade, foram utilizados testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) e análises de correlação (Spearman, para variáveis contínuas). O nível de significância estabelecido foi para $p < 0,05$. Os resultados obtidos foram representados em gráficos Box Plot.

3 RESULTADOS

Foram avaliadas 62 amostras, sendo 30 com diagnóstico de cisto radicular, 27 de granuloma periapical e cinco do grupo controle negativo. Na análise morfológica do grupo controle não foi encontrado nenhum processo patológico. No exame histopatológico dos cistos radiculares e dos granulomas periapicais foram encontrados: infiltrado mononuclear, predominante em 10 casos associados aos granulomas periapicais, e 18 casos associados aos cistos radiculares. A forma mista constituída por infiltrado contendo polimorfonucleares e mononucleares foi observada em 17 casos associados a granulomas periapicais e 12 casos associados aos cistos radiculares. Nos participantes com granulomas periapicais 14 apresentaram fístula, enquanto que nos participantes com cisto radicular foram observados 6 casos com fístulas.

Tabela1 - Distribuição do tipo de infiltrado inflamatório polimorfonucleares/mononucleares e mononucleares e a ausência ou presença de fístulas encontradas nos 57 casos com lesões estudados.

	Infiltrado		Fístula	
	MN	PMN/MN	Ausente	Presente
Cisto radicular	60 %	40 %	80,0%	20,0%
Granuloma periapical	37 %	63 %	48,14%	51,85%

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Ao comparar os granulomas periapicais e os cistos radiculares com o grupo controle, verificou-se que, tanto os granulomas como os cistos apresentaram TLR-2 significativamente maior quando comparados ao grupo controle (Gráfico 1) (Kruskall Wallis; $p < 0,001$). No entanto, ao comparar a expressão do TLR-2 entre as lesões periapicais não houve diferença significativa.

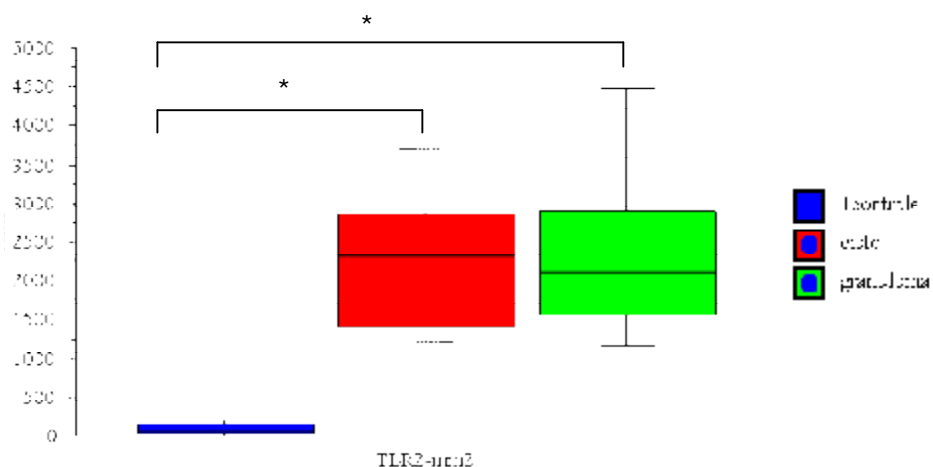


Gráfico 1 – Distribuição do número de células positivas para TLR-2 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais). A linha horizontal representa a mediana, a barra de dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Kruskall Wallis; $p < 0,001$)

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Ao comparar a expressão de TLR-2 nas lesões periapicais associadas com a presença ou ausência de fístulas, observou-se que a expressão de TLR-2 foi significativamente maior nos casos de cistos radiculares com presença de fístula quando comparados com os casos de cistos radiculares sem fístula (Gráfico 2) (Mann-Whitney; $p=0,03$). Não houve diferença significativa entre cistos radiculares com fístulas quando comparados com granulomas periapicais com ou sem fístulas.

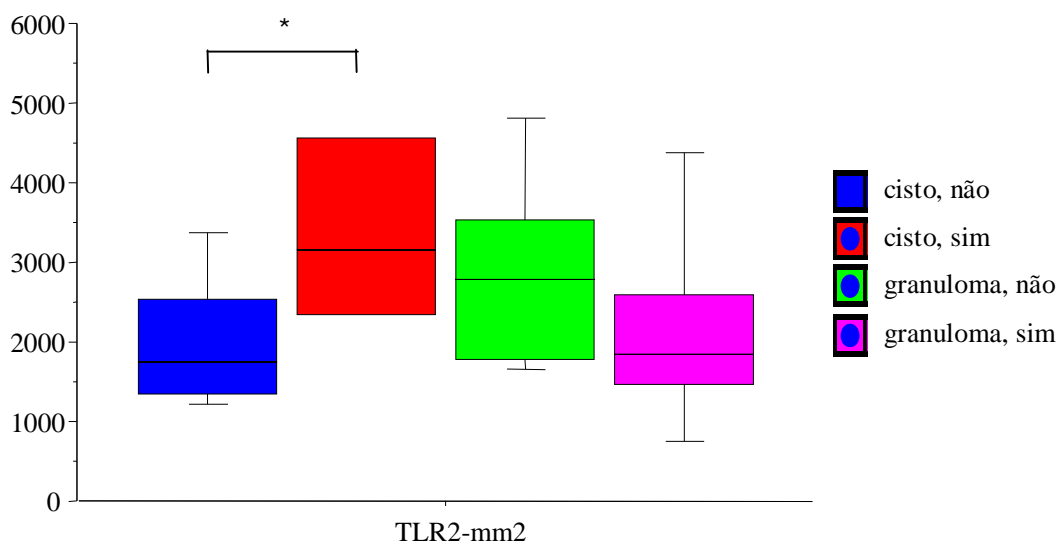


Gráfico 2 - Distribuição do número de células positivas para TLR-2 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístulas). A linha horizontal representa a mediana, a barra de dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p=0,039$)

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Ao comparar a positividade de TLR-2 com o tipo de infiltrado inflamatório não houve diferença significativa (Gráfico 3) (Mann-Whitney; $p = 0,283$).

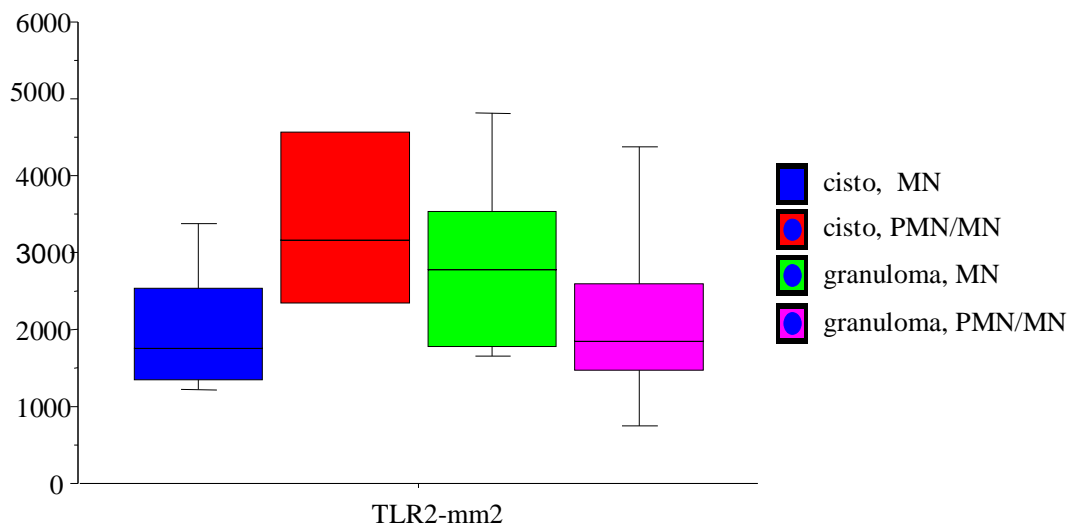


Gráfico 3 - Distribuição do número de células positivas para TLR-2 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado MN e MN/PMN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p=0,283$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

A expressão *in situ* de TLR-4 entre os grupos de cisto radicular e granuloma periapical foi avaliada, no entanto não houve diferença significativa entre os grupos. (Gráfico 4).

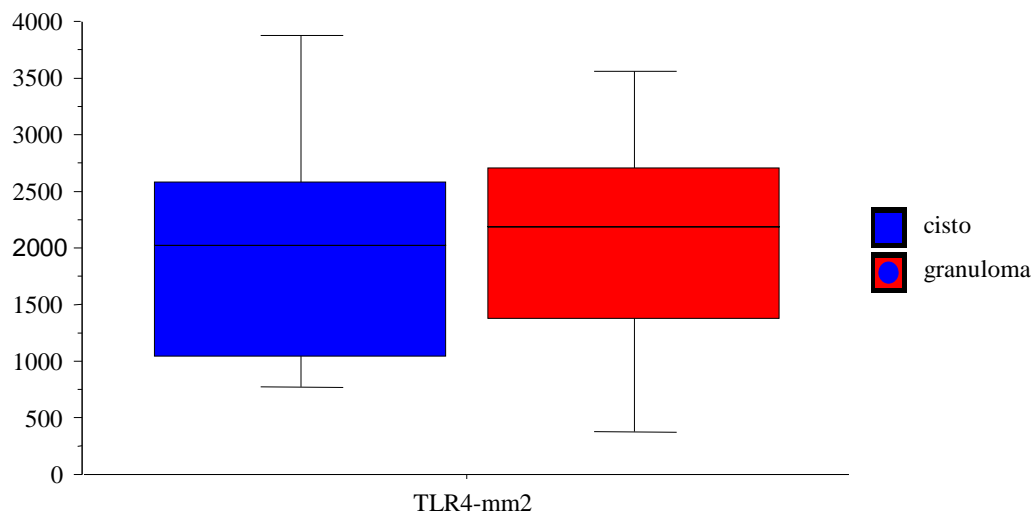


Gráfico 4 - Distribuição do número de células positivas para TLR-4 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann Whitney; p>0,05)

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Em relação à expressão do TLR-4 nas lesões periapicais comparando com ou sem a presença de fístula, observou-se que a expressão de TLR-4 foi significativamente maior nos casos de granulomas periapicais com presença de fístula comparado com os casos de granulomas sem fístula (Gráfico 5) (Mann-Whitney; $p=0,03$). No entanto, quando comparado entre os cistos radiculares não houve diferença significativa. (Gráfico 5) (Mann-Whitney; $p=0,016$).

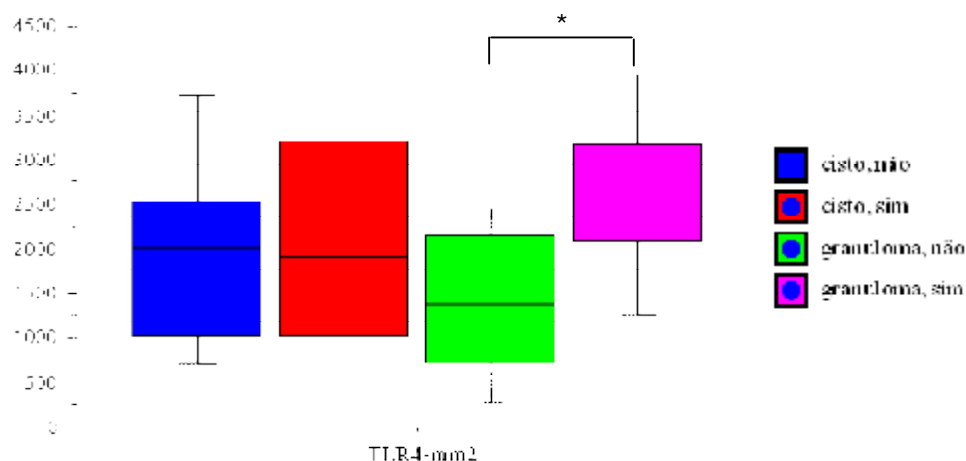


Gráfico 5 - Distribuição do número de células positivas para TLR-4 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístula). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p=0,016$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Ao avaliar a positividade de TLR-4 com o tipo de infiltrado inflamatório (MN e MN/PMN) entre os grupos, não houve diferença significativa (Gráfico 6) (Mann-Whitney; $p>0,05$).

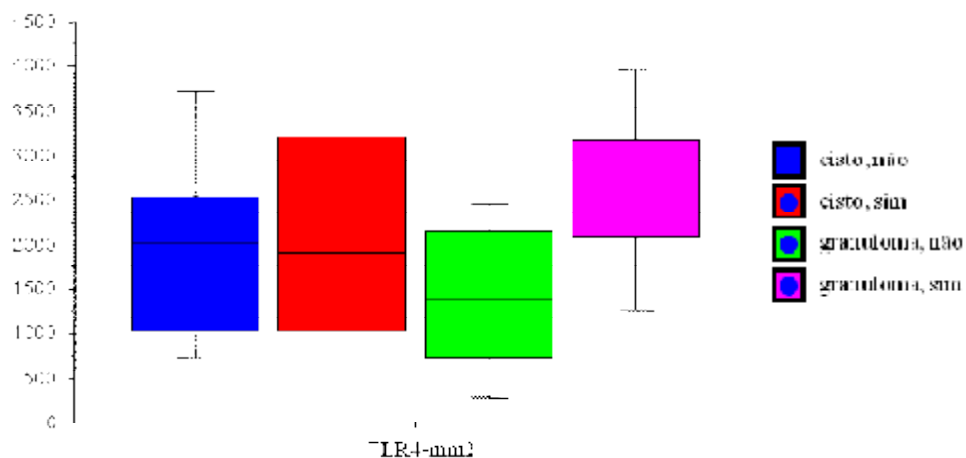


Gráfico 6 - Distribuição do número de células positivas para TLR-4 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado inflamatório MN e MN/PMN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. * (Mann-Whitney; $p>0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

As Gal-3 e Gal-9 apresentaram uma expressão significativamente maior nos granulomas periapicais quando comparados aos cistos radiculares e quando comparados aos tecidos do grupo controle negativo. As Gal-3 e Gal-9 apresentaram uma expressão significativamente maior nos cistos periapicais quando comparados ao grupo controle negativo. (Gráfico 07) (Kruskal-Wallis; $p=0,009$).

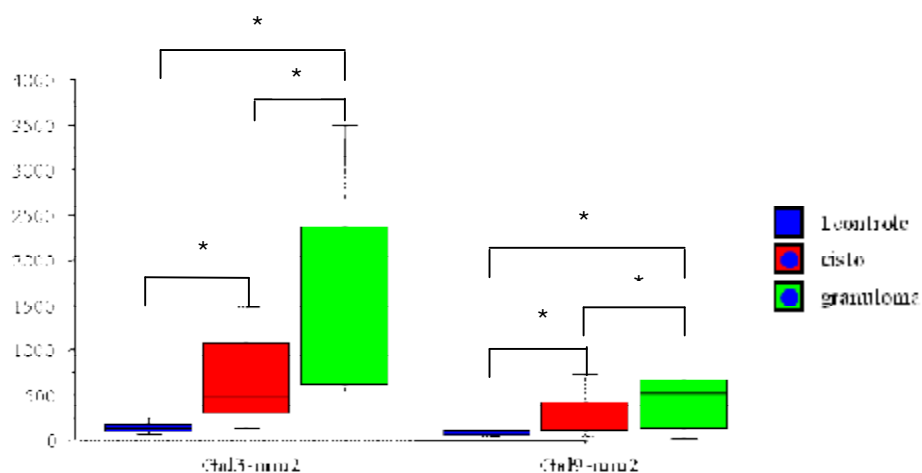


Gráfico 07 - Distribuição do número de células positivas para Gal-3 e Gal-9 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais) e grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Kruskal-Wallis; $p=0,009$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Ao comparar a Gal-3 nas lesões periapicais com presença ou ausência de fístulas nos cistos radiculares e granulomas periapicais não houve diferença significativa (Gráfico 8) (Mann-Whitney; $>0,05$).

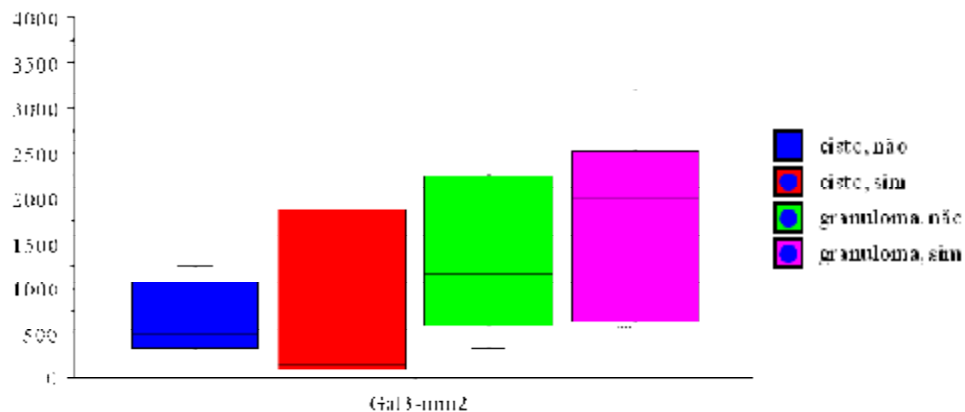


Gráfico 8 - Distribuição do número de células positivas para Gal-3 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístulas). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p>0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

A densidade de imunomarcações da Gal-9 não foi significativa comparando os grupos de cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístulas. (Gráfico 09) (Mann-Whitney; $p > 0,05$).

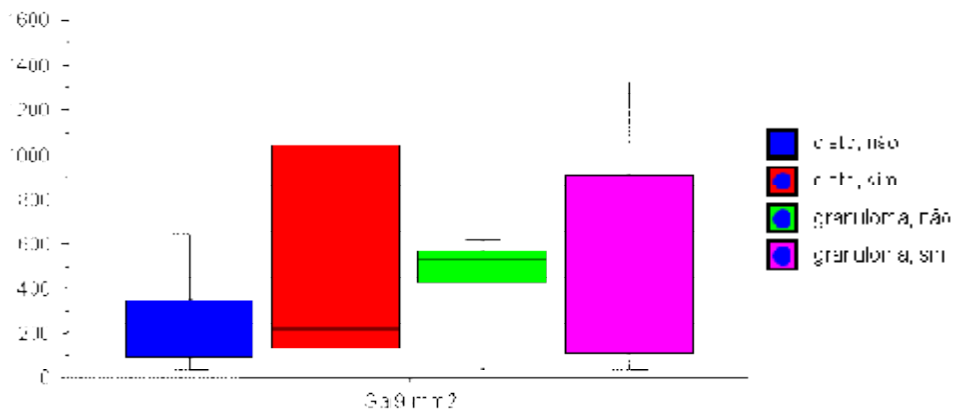


Gráfico 09 - Distribuição do número de células positivas para Gal-9 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com ou sem fístulas). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Foi avaliada a positividade de Gal-3 com o tipo de infiltrado inflamatório (MN e PMN/MN) e também não houve diferença entre os grupos (Gráfico 10) (Mann Whitney; $p > 0,05$)

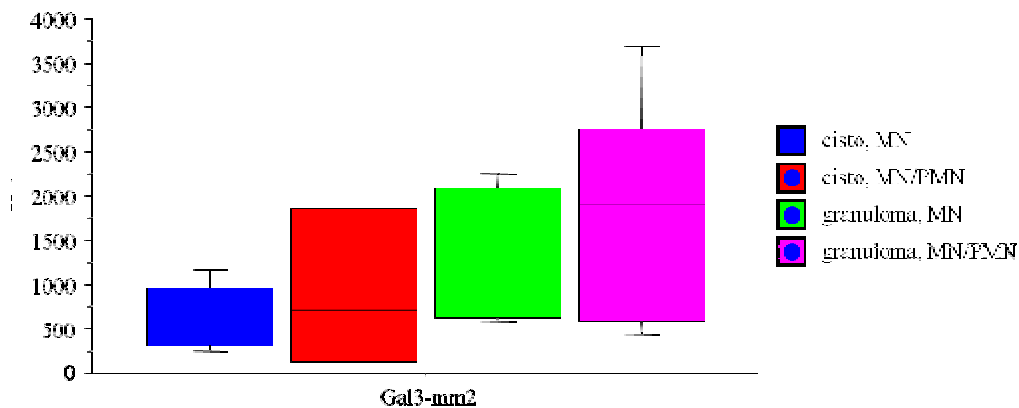


Gráfico 10 - Distribuição do número de células positivas para Gal-3 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado inflamatório MN e PMN/MN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. * (Mann-Whitney; $p > 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Foi avaliada a positividade de Gal-9 com o tipo de infiltrado inflamatório (MN e MN/PMN) nos grupos de cisto radicular e granuloma periapical. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados. (Gráfico 11) (Mann-Whitney; $p > 0,05$).

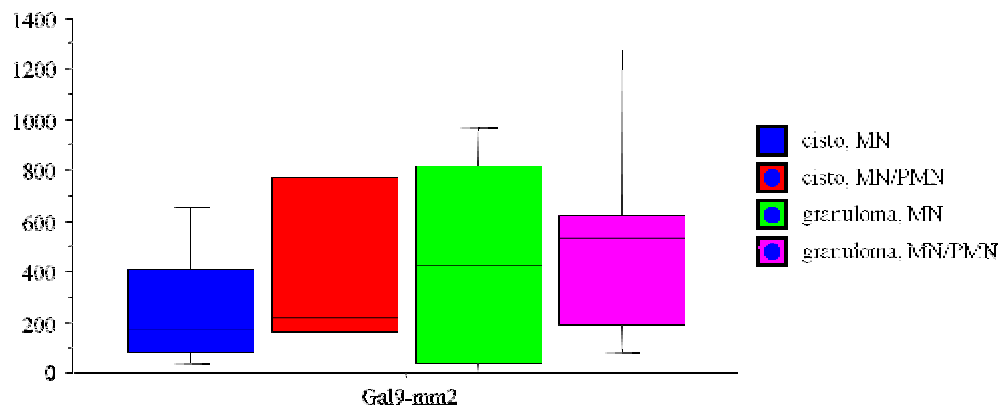
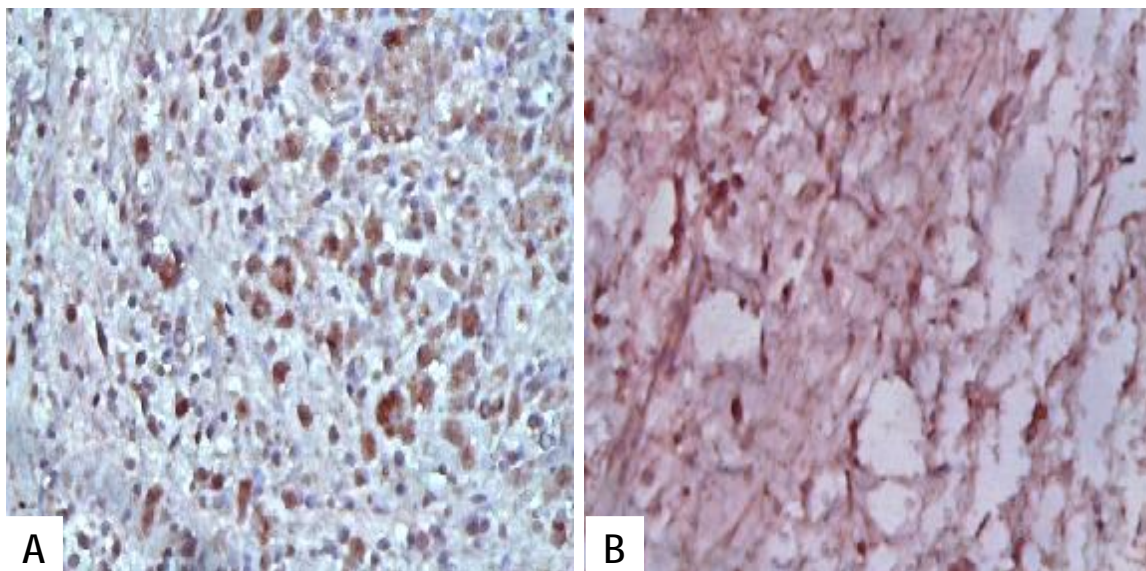
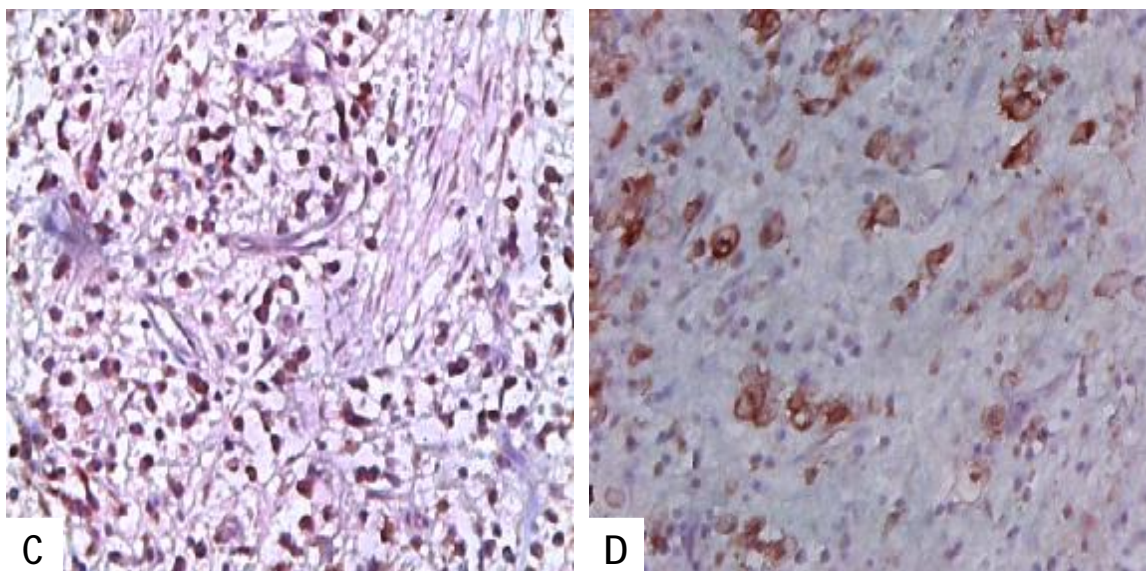


Gráfico 11 - Distribuição do número de células positivas para Gal-9 nas lesões periapicais (cistos radiculares e granulomas periapicais com infiltrado MN e MN/PMN). A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann-Whitney; $p > 0,05$).

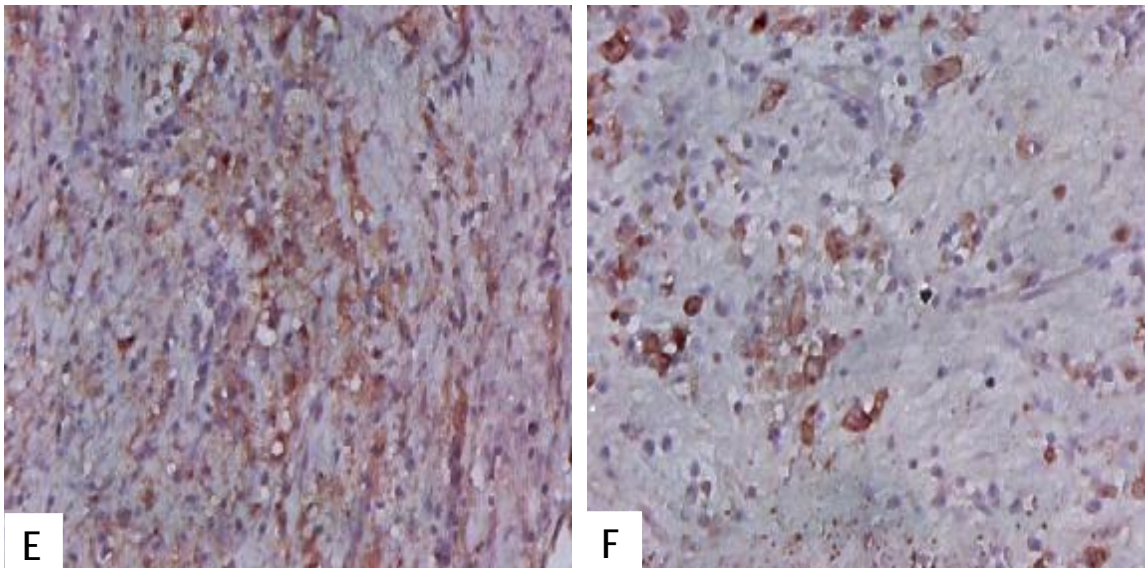
Fonte: Dados da pesquisa, 2012.



Prancha 1: Imunomarcção para TLR-4 em lesões periapicais: (a) TLR-4 em cisto radicular – 40X e (b): TLR-4 em granuloma periapical – 40X.
Fonte: Dados da pesquisa. 2012.

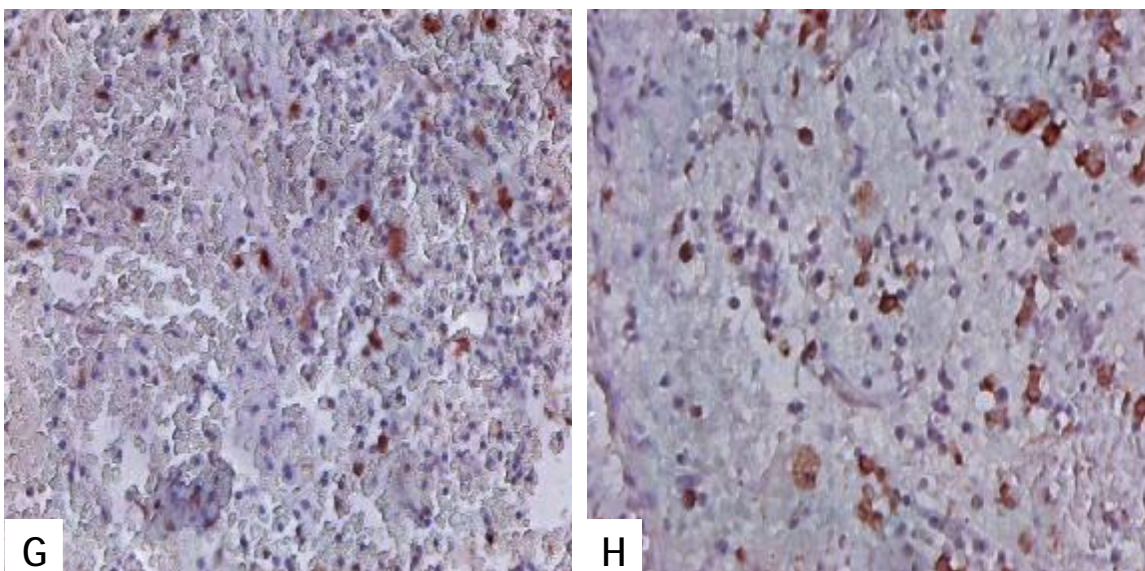


Prancha 2: Imunomarcção para TLR-2 em lesões periapicais: (c) TLR-2 em cisto radicular – 40X e (d): TLR-2 em granuloma periapical – 40X.
Fonte: Dados da pesquisa. 2012.



Prancha 3: Imunomarcção para Gal-3 em lesões periapicais: (e) Gal-3 em cisto radicular – 40X e (f): Gal-3 em granuloma periapical – 40X.

Fonte: Dados da pesquisa. 2012.



Prancha 4: Imunomarcção para Gal-9 em lesões periapicais: (g) Gal-9 em cisto radicular – 40X e (h): Gal-9 em granuloma periapical – 40X.

Fonte: Dados da pesquisa. 2012.

4 DISCUSSÃO

Granulomas periapicais e cistos radiculares representam um espectro de resposta inflamatória de sequestro que pode ser iniciada por uma variedade de agentes, incluindo agentes microbianos infecciosos que atuam nestas lesões. *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* e *Porphyromonas* são as bactérias mais frequentemente isoladas, estando associadas a quadros sintomáticos e sintomatologia persistente (RAZ, PAZERINI, 1988).

Neste estudo, investigou-se a expressão de TLR-2, TLR-4, Gal-3 e Gal-9 em lesões periapicais e no tecido normal da mucosa oral.

A expressão de TLR2 foi significativamente maior em granulomas periapicais e cistos radiculares, quando comparado com o grupo de controle. Além disso, a expressão de TLR2 foi significativamente maior em cistos radiculares com a presença de fístulas. Como não se observou a expressão aumentada de TLR2 em granulomas periapicais, os resultados sugerem que estas lesões passaram por distintos processos de imunomodulação.

Uma expressão significativamente maior de TLR2 em granuloma periapical com fístula quando comparado a granuloma periapical sem fístula e a cistos radiculares, foi descrita (DESAI, LOVE e RICH, 2011), no entanto, em nosso trabalho, o TLR2 foi significativamente maior nos casos em que os pacientes estavam em processo de reagudização nos cistos periapicais, indicando que os granulomas periapicais são mais susceptíveis de serem sustentado pelo sistema imunológico, por reação de antígenos bacterianos, portanto nossos achados não são corroborados com os dados da literatura (DESAI, LOVE e RICH, 2011).

A presença de reagudizações (fístulas) em lesões periapicais crônicas tem sido relatada na literatura associada com a expressão de IL-17, tanto nos granulomas periapicais como em cistos radiculares, e esta reativação da inflamação, ocorre na maioria dos casos de granulomas periapicais (MARÇAL, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que, TLR2 atua no reconhecimento de fibrilas amilóides bacterianas e este aspecto pode representar um novo mecanismo de imunorregulação, o que contribui para a geração de respostas inflamatórias, incluindo a produção de IL-17A e IL-22 (NISHIMORI et al., 2012). Estas citocinas podem promover uma reagudização do processo inflamatório e conseqüentemente a expressão de TLR-2 nas células do infiltrado.

Da mesma forma, observamos um aumento na expressão do TLR-4 nos granulomas periapicais associados com fístula. Acreditamos que o tipo de bactéria que infecta o canal radicular pode ser responsável pela reagudização desse processo e desta forma pode estar interferindo na expressão destes receptores. Os TLR-2 e TLR-4 foram identificados como os principais receptores de sinalização para os componentes da parede celular bacteriana, e demonstrou-se que *P. gingivalis* estimula TLR-2, em vez de TLR-4 (LIEN et al., 1999). O TLR-4 pode reconhecer lipossacarídeo bacteriano (LPS), que se encontra na parede celular das bactérias gram negativas (HOSHINO et al., 1999; PELEDNAN et al., 2001). Este receptor parece contribuir para o desenvolvimento da resposta Th1 normal (HELDWEIN et al., 2003), e quando ativada, induz a expressão de algumas citocinas que estão associadas à reabsorção óssea e a destruição do tecido em lesões endodônticas periapicais (HOU, SASAKI e STASHENKO, 2000; MURAKAMI et al., 2001).

No presente estudo, a expressão da Gal-3 e da Gal-9 foi significativamente maior nos granulomas periapicais, e nos cistos radiculares quando comparados com o grupo controle. Ao comparar as duas lesões periapicais, observou-se que, tanto a Gal-3 como a Gal-9 foram significativamente mais expressas nos granulomas periapicais.

Recentemente, tem sido demonstrado que a Gal-3 liga-se a multimérica LN (LacNAc) e LDN (LacdiNAc) formando GalNAc₁₋₄GlcNAc motivos (NANGIA-MAKER et al., 1993), assim como a estruturas de hidratos de carbono de outros em glicoproteínas e glicolípidos incluindo lipopolissacarídeos LPS a partir de muitos agentes patogênicos (OCHIENG, FURTAK e LUKYANOV, 2004). Através desta atividade, a Gal-3 participa da fagocitose de alguns microrganismos pelos macrófagos e desencadeia respostas do hospedeiro a agentes patogênicos, pelo menos *in vitro* (SANO et al., 2003). Quer seja também contribui para eventos de sinalização em células acessórias durante a infecção *in vivo* é incerto. Da mesma forma, seu papel em vias de sinalização desencadeadas por receptores Toll-like (TLRs), que representam sensores chave nas células inatas (QURESHI et al., 1999), ainda não foi descrito, embora não encontramos estudos relacionando a Gal3 e TLR em lesões periapicais.

Ao compararmos a Gal-3 nas duas lesões periapicais observou-se um aumento significativo nos granulomas periapicais. Acreditamos que a expressão de Gal-3 e TLR2 possam estar associados nestes processos inflamatórios crônicos periapicais colaborando tanto para intensificação da resposta inflamatória como para eliminação das bactérias. No presente estudo foi observada também, uma correlação de positiva e significativa da expressão de Gal-3 com a expressão de mastócitos, tanto nos casos de cistos radiculares como nos granulomas

periapicais. A Gal-3 tem-se mostrado expressa em cultura de mastócitos (FRIGERI & LIU, 1992; LIU et al., 1993) e alguns autores apontam a Gal-3 como uma lectina ativadora de mastócitos (ZUBERI; FRIGERI; LIU, 1994). A Gal-9 em humanos tem sido identificada como um potente quimioatrativo para eosinófilos produzida por células T (MATSUSHITA et al., 2000). Investigação sugere ainda que as N-e C-terminais de CRDs Gal-9 interagem com ligantes idênticos ou estreitamente relacionadas com eosinófilos na membrana (SATO et al., 2002). Galectina-9 também têm propriedades imunomoduladoras, por indução de morte em células Th1 e Th2 células não, através da interação com a molécula de superfície específica de células Th1-TIM-3 (ZHU, 2005).

Assim acreditamos que a expressão da Gal-9 pode estar modulando a resposta inflamatória nestas lesões periapicais crônicas não reagudizadas. Por outro lado, a Gal-3 pode estar associada na exacerbação da resposta inflamatória, na reagudização, ativando vias de TLRs e citocinas do perfil LTh17.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os TLR e as Gal são moléculas envolvidas no processo inflamatório, estão presentes nas células (intra ou extra-celular), e funcionam como receptores celulares na transmissão e/ou indução de sinais químico.

Estas moléculas podem estar presentes em outras condições patológicas, tais como: neoplasias, doença auto imunes, dentre outra condicações.

Este estudo não permite concluir que a expressão de um tipo específico de receptor de superfície celular esteja exclusivamente envolvido na cronificação da lesão periodontal ou em um padrão de evolução clínica destes processos.

Este estudo mostra que: TLR-2 teve expressão significativa e positiva em: granulomas periapicais comparados aos tecidos controles; nos cistos radiculares comparados aos tecidos controles e nos cistos com fístulas comparados aos cistos sem fístulas.

O TLR-4 teve expressão significativa e positiva: nos granulomas com fístulas comparados aos granulomas sem fístulas.

Dentre as galectinas a Gal-3 teve expressão positiva e significativa: nos granulomas periapicais comparados aos cistos radiculares; nos granulomas periapicais comparados aos tecidos controles; já a Gal-9 teve expressão positiva e significativa: nos granulomas periapicais comparados aos cistos radiculares e nos granulomas periapicais comparados aos tecidos controles.

6 CONCLUSÃO

Granulomas periapicais expressam mais galectina- 3 e galectina- 9 que os cistos radiculares e um aumento na expressão de TLR-2 e TLR-4 estão associados com a regudização destas lesões periapicais.

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Immunology**. 17: 406 (6797):782-7, 2000.

AKIRA, S. et al. Mammalian Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol**. Feb; 15(1):5-11, 2006.

AN, H. et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR-2, TLR-4 and TLR-9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. **Immunology**; v. 106, p.38-45, 2002.

ARIKAWA, T. et al. Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating Fc gamma R expression on macrophages. **Clin Immunol**, v.133, p.382–392, 2009.

ARIKAWA T, SAITA N, OOMIZU S, UENO M, MATSUKAWA A, KATOH S, KOJIMA K, NAGAHARA K, MIYAKE M, YAMAUCHI A, KOHROGI H, HIRASHIMA M. Galectin-9 expands immunosuppressive macrophages to ameliorate T-cell-mediated lung inflammation. **Eur J Immunol**, v.40, p.548–558, 2010.

ASAKURA, H. et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. **Journal of Immunology**, 169 p.5912–5918, 2002.

BALASUBRAMANIAN, K. et al. Galectin-3 in urine of cancer patients: stage and tissue specificity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.19 p.16–20, 2008.

BARONDES, S. H. et al. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, 269 p.20807–20810, 1994.

BAUM, L. G. et al. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. **Journal of Experimental Medicine**, 181, p.877–887, 1995.

BEUTLER, B.; RIETSCHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol**. 3: 169-176; 2003.

BI, S. et al. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. **Journal of Biological Chemistry**, 283 p.12248–12258, 2008.

CHOU, F. C.; SHIEH, S. J.; SYTWU, H. K. Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice. **Eur J Immunol**, v.39, p.2403–2411, 2009.

CONSOLARO, A. Dentes com lesão periapical crônica diagnosticada e tratada durante o tratamento ortodôntico: quando retomar a aplicação de forças? **Rev. Clin. Ortodon. Dental Press**, Maringá, v. 7 n.1 – fev. /mar. 2008.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, v.9 p.979–984, 1999.

CRAIG, S. S. et al. Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils. **Anatomical Record**, v.242, p.211–219, 1995.

DAI, S. Y. et al. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**, 175 p.2974–2981, 2005.

DARDALHON, V. et al. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. **J Autoimmun**, v.31, p.252–256, 2008.

DASARI, P.; ZOLA, H.; NICHOLSON, I. C. Expression of Toll-like receptors by neonatal leukocytes. **Pediatr Allergy Immunol**. v.5, nov. 2010.

DESAI, S.V., LOVE, R.M., RICH, A.M., SEYMOUR, G.J. Toll-like receptor 2 expression in refractory periapical lesions. **Int Endod J** 2011;44:907-16, 2011.

DIETZ, A. B. et al. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. **Biochem Biophys Res Commun**, 275:731–738, 2000.

DZIARSKI R. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. **Cell. Mol. Life Sci**. **60**:1793–1804, 2003.

ECHCHANNAOUI, H. et al. Toll-Like Receptor 2- Deficient Mice Are Highly Susceptible to Streptococcus pneumoniae Meningitis because of Reduced Bacterial Clearing and Enhanced Inflammation. **The Journal of Infectious Diseases**. 186, 798-806; 2002.

ELOLA, M. T. et al. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, p.1679–1700, 2007.

FLOTTE, T. J.; SPRINGER, T. A.; THORBECKE, G. J. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. **American Journal of Pathology**, 111 p.112–124, 1983.

FOUSER, L. A. et al. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. **Immunol Rev**, v.226, p.87–102, 2008.

FREEMAN, G. J. et al. TIM genes: A family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. **Immunol Ver**, v.35, p.172–189, 2010.

FRIGERI, L. G & LIU, F. T. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. **J. Immunol**, 148, p.861–869, 1992.

FRIGERI, L. G.; ZUBERI, R. I.; LIU, F. T. Epsilon, B. P., A beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. **Biochemistry**, v.32, p. 7644–7649, 1993.

FUKUMORI, T. et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Res**, 63:8302–8311, 2003.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v.9, p.162–174, 2009.

GAY, C. **Lesiones periapicales**. In: GAY C; BEINI L Eds. Cirugía bucal. Madrid. Ediciones ergon. p.749-80; 1999.

GORDON, J. R.; BURD, P. R.; GALLI, S. J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunol. Today**, v.11, p.458–464, 1990.

HAMA, S. et al. Coproduction of cadherin and vascular endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells in periapical granulomas. **Int Endod J**. 39 (3):179-84; Mar, 2006.

HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L.; ANDERSON, K. V. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**. 29;52(2):269-79. Jan, 1988.

HELDWEIN, K.A., LIANG, M.D., ANDRESEN, T.K., THOMAS, K.E., MARTY, A.M., CUESTA, N. et al. TLR-4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. **J Leukoc Biol**;74:277-86, 2003.

HELDWEIN, K. A. et al. TLR-4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. **J Leukoc Biol.** 74(2): 277-86; Aug, 2003.

HENDERSON, N.C.; SETHI, T. The regulation of inflammation by galectin-3. **Immunological Reviews**, v. 230, p. 160–171, 2009.

HOSHINO, K., TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; et al. Cutting edge: toll-like receptor 4 ;(TLR-4)- deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide evidence for TLR-4 as the Lps gene product. **J Immunol.** 162: 3749-3752, 1999.

HOU, L.; SASAKI, H.; STASHENKO, P. Toll-like receptor 4 – deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. **Infect Immun.** 68: 4681-4687; 2000.

HOUZELSTEIN, D. et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.1177–1187, 2004.

HOYER, K. K. et al. An anti- apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cells lymphomas. **The American Journal of Pathology**, Estados Unidos, v. 164, n. 3, p. 893-902, 2004.

HREN, N.; IHAN, A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. **Arch Oral Biol**, v.54(2), p-156-61, Feb; 2009.

IMAIZUMI, T. et al. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.72, p.486–491, 2002.

INOHARA, H. et al. Cytoplasmic and serum galectin-3 in diagnosis of thyroid malignancies. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 376, p.605–610, 2008.

INOHARA, H.; AKAHANI, S.; RAZ, A. Inohara et al. Galectin-3 stimulates cell proliferation. **Experimental Cell Research, Estados Unidos**, v. 245, n. 2, p. 294-302, 1998.

IRIE, A. et al. Galectin-9 as a Prognostic Factor with Antimetastatic Potential in Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.2962-2968, 2005.

JANEWAY, C. A. J. R.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.** 2002;20:197-216. Epub. Oct 4; 2002.

JAYALAKSHMI, K. B. et al. Platelet-Rich Fibrin with β -Tricalcium Phosphate - A Novel Approach for Bone Augmentation in Chronic Periapical Lesion: **A Case Report; Case Rep Dent.** October, 2012.

KABASHIMA, H. et al. Interferon-gamma-producing cells and inducible nitric oxide synthase-producing cells in periapical granulomas. **J Oral Pathol Med.** 27(3):95-100. Mar; 1998.

KARLSSON, A. et al. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. **Lycobiology**, v.19, p.16–20, 2009.

KASHIO, Y. et al. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. **J Immunol**, v.170, p.3631–3636, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappa B by Toll-like receptors. **Trends Mol. Med.** 13, 460-469; 2007.

KIELIAN T., BARRY B., and HICKEY W.F. CXC chemokine receptor-2 ligands are Required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. **J. Immunol.** 2001. 166:4634–4643, 2001.

KIELIAN T., BEARDEN E. D., BALDWIN A. C., and ESEN N. IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced experimental brain abscess. **J. Neuropathol.** 2004 Exp. Neurol. **63**:381–396, 2004.

KIM, H. R. et al. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. **Cancer Research**, Estados Unidos, v. 59, n. 16, p. 4148-4154, 1999.

KOMORI, M. et al. Pneumococcal Peptidoglycan-Polysaccharides (PGPS) Regulate Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) in the Mouse Middle Ear Epithelial Cells. **Pediatr Res.** Nov 11, 2010.

KRAMER, I. R. H.; PINDBORG, J. J.; SHEAR, M. **Histological typing of odontogenic tumors.** 2. Ed. Berlin: Springer-Verlag, 1991

KUO, L. H. et al. Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. **Diabetologia.** Oct 22; 2010.

KUWABARA, I.; LIU, F. T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **J Immunol**, v.156, p.3939–3944, 1996.

LAFLAMME, N. et al. Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from Gram-Negative and Gram-positive bacteria. **Eur J Immunol**. 33: 1127-1138. 2003.

LATZ, E. et al. *Nat. Immunol.* 5, 190–198; 2004.

LEE, J. W. et al. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplasia. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Alemanha, v. 132, n. 4, p. 241-247, 2006.

LEFFLER, H. et al. Introduction to galectins. **Glycoconj J**, v.19, p.433–440, 2004.

LIA, R.C.C. Patologias periapicais inflamatórias: bases biológicas. In: Cardoso, R. J. A, Gonçalves, E. A. N., editores. **Odontologia: Endodontia /Trauma**. São Paulo: Artes Médicas; p.15-37; 2002.

LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **Int Endod J**. 36(7):464-71. Jul, 2003.

LIEN, E. et al., Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. **J. Biol. Chem.** 274: 33419–33425, 1999.

LIU, F.T., et al., Expression and function of an IgE-binding animal lectina BP in mast cells. **Immunopharmacology** ;26:187–95, 1993.

LIU, F. & RABINOVICH, G. Galectins as modulators of tumor progression. **Nat Rev Cancer**, v.5(1), p. 29-41, 2005.

LIU, F. T et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **Am J Pathol**, v.147, p.1016– 1028, 1995.

LIU, F. T. et al. Expression and function of an IgE-binding animal lectina BP) in mast cells. **Immunopharmacology**, 26, p.187–195, 1993.

LIU, F. T. Molecular biology of IgE-binding protein, IgE-binding factors, and IgE receptors. **Crit Rev Immunol**, v.10, p.289–306, 1990.

LIU, F. T., PATTERSON, R. J., WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochemica and Biophysica Acta**, 1572 p.263–273, 2002.

LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**. 311: 1770-1773; 2006.

LOPEZ, M. J. F., Classification, etiology and pathogenesis of pulp and periapical disease. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 9 suppl, p: 52-62, 2004.

LOTAN, R. et al. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. **Glycoconjugate Journal**, v.11 p.462–468, 1994.

MARÇAL, J. R et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. **J Endod**. 36(6):995-9. Jun, 2010.

MARCATO, L. G. et al. The role of Toll-like receptors 2 and 4 on reactive oxygen species and nitric oxide production by macrophage cells stimulated with root canal pathogens. **Oral Microbiol Immunol**. 23(5): 353-9. Oct, 2008.

MATSUDA, Y. et al. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatology Research**, v.38 p.1098–1111, 2008.

MATSUGUCHI. T. et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. **Clin Diag Lab Immunol**. 10: 259-266; 2003.

MATSUMOTO, R. et al. Biological activities of ecalectin: a novel eosinophil-activating factor. **Journal of Immunology**, v.168 p.1961–1967, 2002.

MATSUMOTO, R. et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, 273 p.16976–16984, 1998.

MATSUSHITA, N., NISHI, N., SEKI, M., MATSUMOTO, R., KUWABARA, I., LIU, F.T, et al. Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction. **J Biol Chem**; 275:8355-60, 2000.

MATSUURA, A. et al. Intracellular galectin-9 activates inflammatory cytokines in monocytes. **Genes Cells**, v. 14, p. 511–521, 2009.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Immunol. Rev.** 77, p.1033–1079, 1997.

METHE, H. et al. J. Expansion of Circulating Toll-Like Receptor 4-Positive Monocytes in Patients With Acute Coronary Syndrome. **J American Heart Association.** May, 2005.

MICHAUD, F. et al. J. Involvement of TLR-2 in recognition of acute gammaherpesvirus-68 infection. **PLoS One.** 29;5(10):e13742. Oct, 2010.

MURAKAMI Y, et al., A possible mechanism of maxillofacial abscess formation. Involvement of Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. **Oral Microbiol Immunol.** 16: 321-325, 2001.

MURAKAMI, Y.; HANAZAWA, S.; TANAKA, S.; et al. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation. Involvement of Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. **Oral Microbiol Immunol.** 16: 321-325, 2001.

NAIR, P. N. R.; Non-microbial etiology: periapical cysts sustain post-treatment apical periodontitis. **Endod Topics.** 6:96-113, 2003.

NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontol 2000.** 13:121-48. Feb, 1997.

Nangia-Makker P, Ochieng J, Christman JK, and Raz A. Regulation of the expression of galactoside-binding lectin during human monocytic differentiation. **Cancer Res.** 53: 5033–5037, 1993.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, Estados Unidos, v. 156, n. 3, p. 899-909, 2000.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. **Annu Rev Immunol**, v.26, p.513–533, 2008.

NISHIMORI, J. H et al.,. doi:10.1128/IAI.00911-12. Epub 2012 Oct 1. Microbial amyloids induce interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 responses via Toll-like receptor 2 activation in the intestinal mucosa. **Infect Immun.** Dec;80(12):4398-408, 2012.

NISHIYA, T. et al. TLR-3 and TLR-7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. **J Biological Chemistry**. vol. 280, no.44, pp. 37107-37117. Nov, 2005.

NOBUHARA, W.K.; DEL RIO, C. E. Incidence of periradicular pathoses in endodontic treatment failures. **J Endod**. 19(6):315-8. Jun, 1993.

NORLING, L.V.; PERRETTI, M.; COOPER, D. Endogenous galectins and control of the host inflammatory response. **J Endocrinol**, v.201, p. 169-184, 2009.

Ochieng J, Furtak J and Lukyanov P. 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj. J.* 19:527–535, 2004.

ORLANDINI, S. et al. Radicular cysts are involved in the recruitment of osteoclast precursors. **J Oral Pathol Med**. 25(6): 325-30. Jul, 1996.

PELEDAN, B.; KUMAS, P.; CUTLER, C. W., et al. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. **J Immunol**. 167:5067-5076. 2001.

PERANZONI, E. et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. **Curr Opin Immunol**, v.22, p.238–244, 2010.

Qureshi SL, Lariviere G, Leveque S, Clermont KJ, Moore P, Gors D. Malo Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*; 189:615–26, 1999.

RABINOVICH, G. A. et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends Immunol**, v.23(6), p.313-20, 2002.

RAMACHANDRAN, N. P. N.; PAJAROLA, G.; SCHROEDER, H.E. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 81(1):93-102. Jan, 1996.

Raz A, Carmi P, Pazerini G. Expression of two different endogenous galactoside-binding lectins sharing sequence homology. *Cancer Res*;48:645-49, 1988.

RICUCCI, D.; BERGENHOLTZ, G. Histologic features of apical periodontitis in human biopsies. **Endod Topics**. 8:68-87, 2004.

RICUCCI, D.; MANNOCCI, F.; FORD, T. R.; A study of periapical lesions correlating the presence of a blade with radiopaque histological findings **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 101. (3):389-94. Mar, 2006.

RUBINSTEIN, N. et al. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 1-12, 2004.

SALUM, T. T. B. et al. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **J Oral Pathol Med**. 2010 Mar; 39(3):250-6. Epub; 21 Jan, 2010.

SAMUELSSON, A.; TOWERS, T. L.; RAVETCH, J. V. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. **Science**, v.291, p.484–486, 2001.

SANO, H., HSU, D.K., APGAR, J.R., YU, L., SHARMA, B.B., KUWABARA, I. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J Clin Investig**;112:389-97, 2003.

SANO, H. et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J Immunol**, v.165, p. 2156–2164, 2000.

SATO, M., NISHI, N., SHOJI, H., SEIKI, M., HASHIDATE, T., HIRABAYASHI, J. Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophilchemoattractant activity. **Glycobiology**; 12:191, 2002.

SATO, S. et al. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. **Journal of Immunology** 168, p.1813–1822, 2002.

SAUSSEZ, S. et al. Galectin-3 upregulation during tumor progression in head and neck cancer. **Laryngoscope**, 118 p.1583–1590, 2008.

SCHWANDNER, R. et al. Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 25, Jun. 1999.

SCHWARTZ, L. B. Mast cells: function and contents. **Curr. Opin. Immuno**. v.6 p. 91–97, 1994.

SEKI, M. et al. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum**, v.56, p. 3968–3976, 2007.

SEKI, M. et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. **Clin Immunol**, v.127, p. 78–88, 2008.

SHEAR, M. Cystos da região bucomaxilofacial: diagnóstico e tratamento. 3th ed. São Paulo: **Ed. Santos**; 1999.

STASHENKO, P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod Dent Traumatol.** 6(3):89-96. Jun, 1990.

SUTHERLAND, A.M.; WALLEY, K.R.; RUSSEL, J.A. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. **Crit Care Med.** 33: 638-644. 2005.

SUZUKI. Y.; INOUE, T.; YOSHIMARU, T. R. A. C. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. **Biochemica and Biophysica Acta**, 1783 p.924–934, 2008.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev. Immunol.** 2003; 21: 335 – 76. Epub: 19 Dec, 2003.

TAKEUCHI, O.K. et al. Differential roles of TLR-2 and TLR-4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity.** 11:443–451; 1999.

TAKEUCHI, O.K.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. TLR-2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. **J. Immunol.** 165:5392–5396; 2000.

TERONEN, O. et al. Mast cell-derived tryptase in odontogenic cysts. **J Oral Pathol Med.** V-25(7), p-376-81, Aug, 1996.

TOSHCHAKOV, V. et al. TLR-4, but not TLR-2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. **Nat Immunol.** 3(4):392-8. 2002.

TROPE, M. et al. Differentiation of radicular cysts and granulomas using computerized tomography. **Endod Dent Traumatol.** 5:69-72. 1989.

TRUONG, M. J. et al. Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. **Journal of Experimental Medicine**, v.177 p.243–248, 1993.

UNDERHILL, D. M. et al. Toll-like receptor-2 mediates *mycobacteria*-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Departments of Immunology and Pathology**. Washington, Oct 1999.

VERSTAK, B.; HERTZOG, P.; MANSELL, A. Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. **Inflamm Res**. 56: 1-10; 2007.

VIER, F. V.; FIGUEIREDO, J. A. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption. **Int Endod J**. 35(8):710-9. Aug, 2002.

VIER, F.V.; FIGUEIREDO, J.A. Internal apical resorption and its correlation with the type of apical lesion. **Int Endod J**. 37(11):730-7. Nov, 2004.

VIJAYARAGHAVAN, R et al. Triple antibiotic paste in root canal therapy. **J Pharm Bioallied Sci**. 4(Suppl 2): S230-S233. Aug, 2012.

WADA, J. et al. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. **J Clin Invest**, v.99, p.2452–2461, 1997.

WANG, F. et al. Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD41CD251 regulatory T cells. **Immunobiology**, v.214, p.342–349, 2009.

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Current Views of Toll-like Receptor Signaling Pathways. **Department of Microbiology and Immunology**. Osaka University. Mar 2010.

YANAGISAWA, S. Pathologic study of periapical lesions. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. **J oral pathol**, v.9(5), p.288-300. Sep, 1980.

YANG, R. Y.; HSU, D. K.; LIU, F. T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, p. 6737–6742, 1996.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Rev Mol Med**, v.10 e17, 2008.

YANG, R.B. et al. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. **J Immunol**. 163: 639-643. 1999.

YOSHIMURA A., LIEN E., INGALLS R.R., TUOMANEN E., DZIARSKI R, GOLENBOCK D. Cutting Edge: Recognition of gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via toll-like receptor 2. **J Immunol**;163;1-5, 1999.

ZHANG, J. P. et al. Human Neonatal Peripheral Blood Leukocytes Demonstrate Pathogen-Specific Coordinate Expression of TLR-2, TLR-4/MD2 and MyD88 During Bacterial Infection In Vivo. **Pediatr Res.** Aug, 2010.

ZHU, C. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. **Nat Immunol**, v.6, p.1245–1252, 2005.

Zuberi RI, Frigeri LDDG, Liu FT. Activation of rat basophilic leukemia cells by-BP, an IgE-binding endogenous lectin. **Cell Immunol**;156:1–12, 1994.

ZUBERI, R. I.; FRIGERI, L. G.; LIU, F. T. Activation of rat basophilic leukemia cells by-BP, an IgE-binding endogenous lectin. **Cell. Immunol**, 156, p.1–12, 1994.