

VALÉRIA PONTELLI NAVARRO TEDESCHI

**PARTICIPAÇÃO DO NERVO TRIGÊMIO E DO MEDIADOR
PROSTAGLANDINA NA FEBRE INDUZIDA POR
ENDOTOXINA NO PERIODONTO DE RATOS.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Grau
de Mestre em Odontologia, Área de
Concentração - Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Ribeirão Preto

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tedeschi, Valéria Pontelli Navarro

Participação do nervo trigêmeo e do mediador prostaglandina na febre induzida por endotoxina no periodonto de ratos. Ribeirão Preto, 2006.

95p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa: Odontopediatria.

Orientador: Branco, Luiz Guilherme de Siqueira

1. Febre 2. Diclofenaco 3. Periodontal 4. Nervo Trigêmeo
5. Lipopolissacarídeo.

VALÉRIA PONTELLI NAVARRO TEDESCHI

**PARTICIPAÇÃO DO NERVO TRIGÊMIO E DO MEDIADOR
PROSTAGLANDINA NA FEBRE INDUZIDA POR
ENDOTOXINA NO PERIODONTO DE RATOS.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Grau
de Mestre em Odontologia, Área de
Concentração - Odontopediatria.

Data da defesa: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dados Curriculares

Valéria Pontelli Navarro Tedeschi

Nascimento	21 de fevereiro de 1980 – Tupã – SP
Filiação	Salvador Rene Navarro Soler Iraci Pontelli
1998-2001	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2002	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico para Bebês Normais e Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2003	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2004-2006	Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

OFEREÇO ESTE TRABALHO

À Deus,

*Por abençoar sempre meus caminhos.
Obrigada Senhor pela minha saúde, pela
minha vontade de crescer, pela minha
profissão, por toda a minha família e amigos.
A vitória, hoje alcançada, me faz testemunha
de Sua presença em minha vida.*

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, Iraci e Salvador,

Agradeço por terem me dado o Dom da vida,

pela educação e bons exemplos,

pelo apoio e incentivo.

Obrigada por sempre torcerem e acreditarem em mim.

Por dividirem comigo as grandes alegrias e as tristezas.

Pelo amor, carinho e por terem construído uma família muito especial.

Amo vocês.

Ao meu marido, Wagner

Obrigada amor pela compreensão, pelos domingos de passeio que foram substituídos por domingos de estudo.

Por ser meu cúmplice, meu refúgio, meu amparo e minha fortaleza.

Pelo incentivo constante e apoio nos momentos difíceis,

por torcer e acreditar em mim.

Pelo seu amor e carinho,

por transformar nossa convivência em momentos únicos, especiais e inesquecíveis.

Agradecimento especial pela intensa participação e colaboração durante todo meu curso de mestrado. Pela companhia nos fins de semana para colocar água para os meus ratos e nesta etapa final na confecção da diagramação e capa deste trabalho. Muito obrigada.

A você, não dedico apenas este trabalho, mas todas as futuras conquistas de minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Agradeço especialmente ao **Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco**,
Por ter me acolhido como orientada,*

*Obrigada Professor,
pelos ensinamentos em pesquisa,
por ter me ajudado tanto desde o início,
pela compreensão e por sempre me ouvir com paciência,
por responder minhas dúvidas mesmo quando estas eram infundadas,
Obrigada pela orientação séria e competente,
por ter me ajudado tanto na redação dos textos,
por me deixar aprender com sua postura limpa, íntegra e seu respeito ao próximo.
Pela amizade, pela confiança e por acreditar em minhas possibilidades.
Pelo incentivo à busca contínua de conhecimento, pelo estímulo em melhorar a
cada desafio, pela enorme contribuição na minha formação pessoal e profissional,
Serei eternamente grata,*

Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no nome da atual Diretora **Profa. Dra. Marisa Semprini** e da Vice-Diretora **Profa. Dra. Sada Assed**.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e do vice-coordenador **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, pela recepção e cordialidade por mim dispensada e por ter me permitido aprender muito com o curso de mestrado. Meu apreço e reconhecimento.

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

Profa. Dra. Sada Assed, pelo exemplo de magnitude e simplicidade e pela dedicação por esta Faculdade.

Profa. Dra. Aldevina Campos Freitas, pelo dinamismo e amor pelo trabalho e pelas crianças.

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, pelo exemplo de determinação e dedicação ao ensino e a pesquisa.

Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, pela competência e entusiasmo com o ensino. Pelo amor a esta Faculdade.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato, pela competência, exemplo de equilíbrio e amizade.

Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queirós, pelos ensinamentos, atenção e amizade.

Profa. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano, pelos ensinamentos, companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. Gisele Faria, pela disposição em ensinar e amizade.

Aos Professores da FORP, em especial à **Profa. Dra. Helena Paranhos**, **Prof. Dr. Vinícius Pedrazi**, **Profa. Dra. Maria José Alves Rocha**, **Profa. Dra. Mírian Matsumoto**, **Prof. Dr. Adilson Tomazinho**, **Profa. Dra. Maria Bernadete S. Stuani**, **Prof. Dr. José Tarcisio L. Ferreira** e **Profa. Dra. Maria Conceição Saraiva** meus sinceros agradecimentos.

Aos meus **irmãos Gisele e Evandro**, obrigada pelo companheirismo e amizade e por dividirem comigo tantos momentos especiais. Vocês são meus eternos companheiros.

À minha **avó Elidia**, **avô Eliseu**, **avó Isabel** (*in memoriam*) e **avô Bartolomeu** (*in memoriam*) por estarem sempre torcendo por mim.

À minha segunda família: **Wagner**, **Cleusa**, **Letícia**, **Georgina**, **Belarmino**, **Jandira** (*in memoriam*) e **Alberto**, agradeço o carinho, a compreensão e a torcida pelo meu sucesso.

A todos meus familiares meus agradecimentos.

Aos meus amigos de turma da graduação: **Rose**, **Leandro**, **Marcela**, **Ana Márcia**, **Eliana**, **Ariane**, **Carla**, **Jorge**, **Paula**, **Marcelo**, **Pablo**, **Breno**, **Renata**, **Vanderlei**, **Kemli**, ... Obrigada pela amizade e pelo apoio. Aprendi muito com vocês. É muito bom poder compartilhar com vocês minhas ansiedades e alegrias.

AGRADECIMENTOS

*Aos meus amigos de turma do mestrado: **Adriana, Andréia, Francisco e Fumio**, agradeço a cumplicidade, o respeito e o nosso espírito de união que conseguimos cultivar durante estes dois anos. Foi muito bom crescer junto com vocês.*

*A todos os Pós-Graduandos da Odontopediatria, em especial: **Carol, Denise, Fabrício, Glauce, Raquel e Renata**, por terem compartilhado muito de minhas dificuldades e anseios.*

*Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia: **Alexandre, Camila, Carol, Diego, Giovani, Gustavo, Kênia, Lidiane, Luciane, Maria Ida, Maristela, Mirela, Renata e Tatiane**. Meu eterno agradecimento por tudo que me ensinaram. Obrigada pela disposição em muitas vezes pararem o que estavam fazendo para me ajudar a sanar minhas dúvidas. Agradeço a amizade, o companheirismo e ter trabalhado por dois anos na companhia de vocês me acrescentou muito pessoalmente e profissionalmente. Muito obrigada.*

*Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social: **Ditinha, José, Vera, Fátima, Nilva, Marco e Rejane**. E funcionários da Clínica de Pacientes Especiais: **Fátima, Nadir, Renata e Oswaldo**. Obrigada pelo atendimento eficiente e cordial e pela amizade.*

*Às secretárias da Pós-Graduação: **Isabel e Regiane** pela atenção e paciência.*

*À secretária da Fisiologia **Meire**, pelo apoio e disponibilidade em ajudar.*

AGRADECIMENTOS

*Agradecimento especial a **Lidiane, ao Gustavo e ao Mauro** pelo excelente apoio técnico na realização deste trabalho.*

*Agradeço aos **animais** utilizados nos experimentos, que estes resultados contribuam para o avanço da ciência.*

*À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela bolsa concedida e auxílio financeiro, indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.*

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, minha lembrança e minha gratidão.

1. RESUMO

Tedeschi, V.P.N. Participação do nervo trigêmeo e do mediador prostaglandina na febre induzida por endotoxina no periodonto de ratos. [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2006.

A indução sistêmica de citocinas e prostaglandinas tem um importante papel no desenvolvimento da febre. Porém, a possível indução de febre por LPS local e indução de prostaglandinas localmente nos tecidos periodontais nunca foram avaliados. Desse modo, nós testamos a hipótese que o trigêmeo é uma via neuronal termoaférente que sinaliza o cérebro durante a periodontite aguda e esta resposta envolve participação das prostaglandinas. Portanto, ratos receberam uma injeção "intra-pouch" gengival de solução salina ou *Escherichia coli* lipopolissacarídeo (LPS), 10 e 100 µg/kg. Alguns animais foram pré-tratados com o anestésico local mepivacaína ou tiveram os seus nervos maxilares transecionados. Um outro grupo de animais foram pré-tratados com o inibidor não seletivo das cicloxigenases diclofenaco. A temperatura corporal (Tc) foi medida por biotelemetria antes e após as injeções. O LPS elicitou um aumento na temperatura dose dependente, que foi abolido pela mepivacaína, transecção bilateral do nervo trigeminal maxilar e pelo diclofenaco. Resultados indicam que há uma ativação dos nervos periodontais para induzir a febre por LPS. Eles também mostram que formação local de prostaglandina participa no desenvolvimento da febre. Além disto, imunohistoquímica detectou expressão de *c-fos* no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na área pré-óptica do hipotálamo (POA) duas e três horas após a injeção de LPS, confirmando novamente o papel do trigêmeo sinalizando o cérebro na periodontite aguda.

Palavras chave: febre, diclofenaco, periodontal, nervo trigêmeo, lipopolissacarídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
4 RESULTADOS	39
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS	63
8 ANEXOS	73

3. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A infecção dos tecidos bucais e sua relação com a saúde geral tem sido estudada há mais de um século. A disseminação dos microrganismos, ou de suas toxinas, pelo corpo, advindos de uma infecção bucal local, pode iniciar ou exacerbar uma doença sistêmica ou danificar tecidos distantes (Daland, 1916, Gilmer, 1916, Hunter, 1921, Thompson, 1925, Van Dyke *et al.*, 1986). Esse conceito tornou-se conhecido como Teoria da Infecção Focal (*cf.* Murray, 2000).

Existe a possibilidade de microrganismos advindos de infecções bucais terem a capacidade de induzir artrite reumatóide (Goadby, 1911). Há comprovações científicas que os microrganismos advindos de bacteremias bucais são responsáveis por mais de 25 por cento dos casos de endocardite bacteriana e outras doenças cardíacas, incluindo defeitos valvulares e defeitos congênitos (Abrahamson, 1931, Geiger, 1942).

As bacteremias de origem bucal são provenientes de infecção do órgão dental ou dos tecidos periodontais e podem ser precipitadas por procedimentos de manipulação da cavidade bucal, como uma simples escovação dental (Rise *et al.*, 1969, Sconyers *et al.*, 1973), procedimentos de raspagem e alisamento radicular ou mesmo por profilaxia (DeLeo *et al.*, 1974), além, obviamente, de procedimentos mais invasivos como o tratamento endodôntico (Leonardo *et al.*, 2004), ou extrações (Eisenbud, 1962).

A probabilidade de ocorrência de um distúrbio sistêmico advindo de um foco de infecção bucal é maior em indivíduos suscetíveis com uma resposta imune reduzida, dentre eles incluímos os pacientes cirróticos, (Borowsky *et al.*, 1979), pacientes que fazem uso regular de esteróides (Latronica e Shukes, 1973), crianças com idade precoce e pacientes idosos (Navazesh *et al.*, 1995). Outros autores têm sugerido que existe uma relação entre doença periodontal e aborto espontâneo e nascimentos de bebês prematuros (Boyd *et al.*, 1994) e doença

periodontal e nascimentos de pré-termos com baixo peso (Offenbacher *et al.*, 1996).

A febre de origem desconhecida tem sido descrita como um possível sintoma de infecção bucal na literatura médica há muitos anos (Alt e Barker, 1930, Petersdorf e Beeson, 1961) e a infecção bucal associada com a saúde geral tem sido relatada em muitos casos clínicos (Berry e Silver, 1976, Levinson e Barondess, 1979, Hedstrom *et al.*, 1980, Siminoski, 1993). O envolvimento dos pirógenos com o canal radicular (Shinoda *et al.*, 1987) ou com a doença periodontal (Katz *et al.*, 1992) tem sido citada como a mais provável causa de febre, nestes pacientes. Desta forma, caracteriza-se uma ligação entre os vários distúrbios bucais e as doenças sistêmicas (Van Velzen *et al.*, 1984, Meurman, 1997). A presença de endotoxinas em bolsas periodontais de pacientes apresenta um grande potencial pirogênico. LPS coletado de bolsas periodontais humanas ocasionaram febre bifásica quando inoculadas em coelhos (Kurimoto *et al.*, 1986). De modo similar, a resposta febril e a perda de peso corporal tem sido relatados em um grande número de pacientes que apresentavam abscessos periodontais (Schroder, 1979). Já em crianças, há relatos de doença periodontal causando febre e neutropenia (Fukai, 1989).

A importância da regulação da temperatura corporal (T_c) é reconhecida pela ciência há muito tempo. Em 1808 James Curry já havia relatado que a capacidade de um animal preservar seu próprio calor frente às variações da temperatura do meio em que vive, é fundamental para a manutenção da vida (c.f. Milton, 1998).

De fato, a importância da termorregulação fica evidente observando-se o efeito da temperatura sobre diversas funções fisiológicas e bioquímicas básicas, como, por exemplo, nos seguintes processos: reações enzimáticas (Dejours, 1981), contratilidade muscular (Wasserstrom & Vites, 1999), interação hormônio-receptor (Hinkle *et al.*, 1980), atividade neuronal (Aihara *et al.*, 2001) e função imunológica (Wenish *et al.*, 1996).

A temperatura corporal é mantida constante através de dois mecanismos: o mecanismo termorregulador comportamental, mais eficiente e mais econômico,

pois envolve a troca de calor de forma passiva, do organismo com o ambiente por ele selecionado (Cabanac, 1998) e os mecanismos autonômicos, que independem das condições ambientais, são regulados de maneira involuntária e consistem em mecanismos de ganho de calor (produção e conservação) e mecanismos de perda de calor. A produção de calor dá-se pelo metabolismo basal, pela termogênese por tremor e por não-tremor, enquanto que a conservação de calor ocorre, principalmente, por vasoconstrição periférica e piloereção. Já os mecanismos de perda de calor envolvem vasodilatação periférica, ofegação e sudorese. Todos esses mecanismos são controlados pelo sistema nervoso autônomo e o balanço entre ganho e perda de calor determina a temperatura corporal do animal (Szelényi & Székely, 1979; Werner, 1998).

Desta forma, podemos definir o “*set point*” termorregulatório (ponto de regulação), que é o fator determinante da ativação ou não dos mecanismos de ganho ou perda de calor e corresponde a um valor de temperatura ou faixa de valores em torno da qual a temperatura corporal é regulada (Dinarello *et al.*, 1988; Boulant, 2000). Se a T_c não coincidir com esse ponto de regulação, mecanismos termorreguladores apropriados são ativados para corrigi-la. Dessa forma, se a T_c estiver acima do *set point*, são ativados os mecanismos compensatórios de perda de calor e inibidos os mecanismos de ganho de calor, proporcionando a redução da T_c ao seu valor normal. Ao contrário, se a T_c estiver diminuída, são ativados os mecanismos de ganho de calor, enquanto que os mecanismos de perda de calor são inibidos, elevando a T_c ao seu valor de normalidade.

A febre é descrita como um aumento regulado da T_c (Kluger, 1991). A resposta febril é uma reação fisiológica complexa que ocorre em consequência à invasão do organismo por agentes infecciosos dentre eles vírus, leveduras e bactérias.

Estes agentes invasores desencadeiam o processo inflamatório. Este processo inflamatório vem acompanhado de respostas de fase aguda e tardia, sendo a primeira responsável pela restrição do dano e a segunda pelo reparo tecidual (Blatteis *et al.*, 2000; Zeisberger, 1999). A resposta de fase aguda (RFA) é caracterizada por múltiplas respostas mediadas pelo SNC incluindo febre, cefaléia,

alteração na secreção de hormônios adrenais e hipofisários, mudanças no ciclo sono-vigília, anorexia, inatividade, náuseas e emese. Dentre essas respostas, a mais predominante é a febre (Blatteis *et al.*, 2000; Elmquist *et al.*, 1997).

Na febre os mecanismos de produção e conservação de calor passam a ser controlados mediante um novo “*set point*”, mais elevado que o normal. Dessa forma, mecanismos autonômicos e comportamentais são ativados, resultando em aumento da produção e conservação de calor. (Saper & Breder, 1994). As mudanças comportamentais típicas incluem a procura por ambientes mais quentes e a adição de roupas, enquanto que as alterações autonômicas incluem vasoconstrição, termogênese por tremor e por não tremor (Blatteis, 2000).

A febre é um mecanismo que vem sendo preservado ao longo da evolução, sendo um forte indício de que ela deve possuir papel protetor e adaptativo. De fato, estudos demonstraram que pequenas elevações na temperatura corporal aumentam a eficiência do sistema imunológico em combater agentes invasores, a saber: (a) estimulação da migração de neutrófilos (Nahas *et al.*, 1971); (b) estimulação da secreção de produtos antibacterianos (Van Oss *et al.*, 1980); (c) aumento da produção e atividade do interferon (Downing *et al.*, 1987; Heron & Berg, 1978); (d) ativação dos linfócitos T. Além disso, a febre representa condições desfavoráveis para o crescimento da maioria dos microorganismos patogênicos (Garibaldi, 1972; Grieger & Kluger, 1978).

Alguns estudos revelaram que a febre moderada tem efeito benéfico na mortalidade e morbidade durante infecções. Nesse sentido, foi observado que peixes, lagartos e mamíferos apresentam maior sobrevivência frente à infecção quando desenvolvem febre (Kluger *et al.*, 1975; Kluger, 1991; Hasday & Garrison, 2000) e a redução da febre com agentes antipiréticos aumenta a mortalidade em lagartos com infecção viral (Bernhein & Kluger, 1976) e coelhos com infecção bacteriana (Vaughn *et al.*, 1980). Estudos clínicos também mostraram correlação entre febre e diminuição da morbidade e mortalidade em uma variedade de infecções (Bryant *et al.*, 1971; Mackowiak *et al.*, 1980; Weinstein *et al.*, 1978). É importante destacar que apesar de diversas linhas de evidências indicarem que a febre é uma resposta benéfica, deve-se considerar, no entanto, que valores de

temperatura corporal muito elevados e por períodos prolongados podem ser prejudiciais para o bom funcionamento do organismo, podendo levar até à morte (Kluger *et al.*, 1975).

O modelo mais usado e universalmente aceito para reproduzir experimentalmente a febre é a injeção de lipopolissacarídeo (LPS), que é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas (Kluger, 1991).

A endotoxina começou a ser descoberta por volta do ano de 1870, quando pesquisadores demonstraram que bactérias produzem doenças por meio da produção de toxinas. Inicialmente identificaram as exotoxinas, substâncias secretadas ativamente por muitas bactérias como aquelas responsáveis pela difteria, tétano e botulismo. Hoje sabe-se que as exotoxinas são geralmente proteínas, que na época foram caracterizadas pela susceptibilidade à inativação pelo calor (*c.f.* Rietschel & Brade, 1992). Em 1892, pesquisadores descreveram toxinas que não se ajustavam ao perfil das exotoxinas. Richard Pfeifer identificou uma substância resistente ao calor, que parecia ser liberada de bactérias desintegradas. Assumindo que essa substância estaria dentro das bactérias, Pfeifer a nomeou de endotoxina (do grego, *endo*, dentro). Trabalhos subseqüentes revelaram que as endotoxinas, na verdade residem na superfície de bactérias gram-negativas e não no seu interior, mas essa terminologia permanece até os dias de hoje (*cf.* Rietschel & Brade, 1992).

Somente nas décadas de 1930 e 1940 a estrutura das endotoxinas começou a ser conhecida e foi observado que elas são constituídas por moléculas de polissacarídeos, lipídeos e proteínas, e a parte mais virulenta desse LPS é denominada de *Lipídeo A* que é a estrutura responsável pela citotoxicidade e pelos efeitos pirogênicos da endotoxina. O *Lipídeo A* é formado, principalmente, de açúcares (glicosamina) ligados a fosfatos e longas cadeias de ácidos graxos, cada um com cerca de 14 átomos de carbono (Raetz & Whitfield, 2002).

Uma célula bacteriana contém aproximadamente $3,5 \times 10^6$ de moléculas de LPS que ocupam uma área de $4,9 \mu\text{m}^2$. Isso significa que $\frac{3}{4}$ da superfície celular bacteriana consiste de LPS, sendo a área remanescente composta por proteínas (Rietschel *et al.*, 1994).

Estas moléculas de LPS são liberadas da superfície da bactéria gram-negativa quando as bactérias morrem ou se multiplicam. Uma vez livres, elas não produzem seus efeitos diretamente, mas ligam-se as células particulares induzindo-as a secretarem moléculas mediadoras. Os macrófagos são os alvos principais. Inicialmente, o LPS liga-se à proteína ligadora de LPS (LBP), principalmente na porção do Lipídeo A (Tobias *et al.*, 1989). O complexo LPS/LBP interage com um receptor conhecido como CD-14, presente na superfície dos macrófagos (Wright *et al.*, 1990). Esse receptor não tem capacidade de gerar sinal transmembrana, pois está associado à proteína G inibitória, no entanto, interage com outro receptor, conhecido como Toll-Like 4 (TRL4) (Hoshino *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 1999). O TRL4 ativado, recruta uma proteína adaptadora (MyD88) que interage com uma proteína quinase serina-treonina (IRAK) (Wesche *et al.*, 1997; Medzhitov *et al.*, 1998). A IRAK é auto-fosforilada e ativa a via das MAP-quinases, gerando uma cascata de eventos que resultam na ativação e fosforilação da I κ B-quinase (IKK). A IKK fosforila o I κ B (inibidor do NF- κ B), induzindo a liberação do NF- κ B, o qual juntamente com outro fator de transcrição (AP-1), membro da família JUN e FOS, transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes de mediadores (Barnes & Karin, 1997; Karin & Ben-Neriah, 2000).

O Lipídeo A é capaz de estimular macrófagos a produzirem três grupos de mediadores: proteínas, radicais livres de oxigênio e lipídeos. Dentre as proteínas, temos principalmente as seguintes citocinas: o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Blatteis & Sehic, 1997), as interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8), e o interferon- γ (IFN- γ). Dentre os radicais livres, temos os radicais livres de oxigênio como, por exemplo, os super óxidos e óxido nítrico (NO) (Steiner e Branco, 2001) e dentre os lipídeos temos a prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxana A₂ e o fator de ativação plaquetária. Quando o nível destes mediadores produzidos é baixo temos efeitos benéficos ao organismo como uma febre moderada, estímulo generalizado do sistema imune e a morte microbiana. Porém quando esses mediadores são superproduzidos, temos efeitos prejudiciais ao organismo, como grandes

alterações na temperatura corporal, hipotensão, alterações da crase sanguínea e choque séptico (Rietschel e Brade, 1992).

Para que a resposta febril ocorra, é necessária a comunicação entre o sistema imune e o SNC, onde ocorre a regulação da T_c. Sinais da periferia alcançam o SNC por meio de três principais vias: 1) via fibras aferentes que trafegam principalmente pelo nervo vago e fazem sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário (NTS) (Blatteis *et al.*, 2000); 2) via órgãos circumventriculares como o organum vasculosum laminal terminalis (OVLT) e órgão subfornical, os quais não contêm barreira hemato-encefálica (Takahashi *et al.*, 1997); e 3) via interação com células localizadas na interface hemato-encefálica, i.e., células endoteliais (Tilders *et al.*, 1994) e perivasculares (Elmquist *et al.*, 1997). Essas vias aferentes transportam os sinais pirogênicos para a região pré-óptica do hipotálamo (POA), onde a informação é integrada e uma resposta efetora apropriada é elaborada (Boulant *et al.*, 1998). A POA é considerada o principal sítio termorregulador do organismo. A POA, além de possuir sensibilidade térmica local, recebe informações dos termorreceptores periféricos, o que possibilita a integração de informações térmicas locais e ambientais para a geração de respostas termorreguladoras apropriadas (Boulant, 1998; 2000). Os termorreceptores periféricos são terminações nervosas livres de pequeno diâmetro, não mielinizadas, ou seja, fibras aferentes do tipo C. Existem dois tipos básicos de termorreceptores periféricos: os sensíveis ao frio e os sensíveis ao calor. Os termorreceptores sensíveis ao frio aumentam sua frequência de disparo com a diminuição da temperatura, enquanto que os termorreceptores sensíveis ao calor elevam sua atividade com o aumento da temperatura. Na POA, essas células especializadas recebem informação térmica não somente periférica, mas também dos próprios termorreceptores centrais localizados na medula espinhal (Boulant & Hardy, 1974). Assim, como resultado da comparação e integração das informações térmicas centrais e periféricas, a POA pode provocar respostas termorreguladoras mais apropriadas às condições internas e ambientais (Boulant, 2000). Isso é possível graças à comunicação da POA com áreas efetoras

específicas presentes no tronco encefálico que controlam mecanismos autonômicos de produção e perda de calor (Kanosue *et al.*, 1994; 1994b).

Estudos indicam que a PGE₂ é o mediador mais proximal que age nos neurônios termossensíveis na POA, alterando a sensibilidade dos neurônios dessa região, e assim, desencadeando a resposta febril (Blatteis & Sehic, 1998).

No entanto, a febre e outras respostas patológicas mediadas pelo SNC podem também ocorrer na ausência de aumento substancial do nível sanguíneo circulante destas citocinas, desta forma, o estímulo dos nervos sensoriais periféricos transporta os sinais da ativação do sistema imune para o SNC (Ross, *et al.*, 2003).

Encontramos na literatura recente, protocolos que simulam infecções localizadas no corpo de animais por meio de uma bolha de ar (“air-pouch”), (Miller *et al.*, 1997 e Cartmell, *et al.*, 2003), ou de implante de uma cânula de polietileno (Ross *et al.*, 2000), no dorso de animais como ratos e cobaias onde podem ser injetados LPS e outras substâncias a serem testadas. Este modelo experimental de febre tem sido empregado no qual o LPS é administrado não sistemicamente, mas localmente em bolha de ar subcutânea no dorso de animais (algumas vezes combinado com implantação de cânula subcutânea), neste modelo experimental o LPS não é detectado na circulação (Roth *et al.*, 2000).

Experimentos piloto foram realizados em nosso laboratório no intuito de adaptar estes procedimentos ao periodonto de proteção de ratos. Encontrou-se dificuldade para manutenção da bolha de ar, mas a técnica do implante de uma cânula de polietileno foi muito bem sucedida. Portanto esta metodologia, que nunca foi aplicada ao periodonto, simula uma infecção local e contrasta com a injeção de LPS intraperitoneal ou intravenosa, as quais mimetizam infecção sistêmica.

A inervação somatossensorial da face e da cavidade bucal de mamíferos é suprida principalmente pelos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmio (Lazarov, 2001 e Byers e Dong, 1989). Há evidências que indicam que a lesão dos ramos dos nervos do sistema trigeminal difere daquelas encontradas após injúrias dos nervos periféricos (Fried *et al.*, 2001). Adicionalmente, em humanos, a dor

craniofacial também mostra algumas diferenças da dor envolvendo nervos espinhais (Matthews, 1989; Menetrey e Basbaum, 1987; Nakamura e Ferreira, 1987 e Sessle, 1986). Todavia, as possíveis diferenças entre os papéis exercidos pelos mediadores inflamatórios seguidos de injúrias dos sistemas de nervos trigeminais e periféricos nunca foram estudados.

Recentemente a proteína FOS, produto da expressão do proto-oncogene *c-fos*, detectada por meio de imunocitoquímica, tem sido amplamente utilizada como marcadora da atividade neuronal (Morgan e Curran, 1989). A expressão de FOS é induzida no SNC de animais por estímulos farmacológicos, elétricos, cirúrgicos e alguns estímulos fisiológicos. A expressão desta proteína tem sido muito utilizada por possibilitar um mapeamento da atividade neuronal e elucidar as interações entre os diversos circuitos neuronais do SNC (Morgan e Curran, 1989).

A expressão de *c-fos* foi detectada na medula espinhal por estímulo inflamatório e nociceptivo (Hunt *et al.*, 1987), no sistema trigeminal, também por estímulo nociceptivo (Magdalena *et al.*, 2004; Coimbra e Coimbra, 1994) e em resposta a administração de endotoxina intraperitonealmente em vários núcleos cerebrais (Valles *et al.*, 2005). Entretanto, não existe relatos na literatura sobre a possível expressão de *c-fos* nos núcleos do sistema trigeminal após injeção de LPS no periodonto.

Deste modo, evidencia-se que há uma rica produção de conhecimento em relação às respostas fisio-patológicas frente à infecção sistêmica, principalmente utilizando-se do modelo da injeção sistêmica de LPS. Por outro lado, as respostas às infecções locais, utilizando-se o modelo de “air-pouch”, são bem mais escassas (Miller *et al.*, 1997 e Cartmell, *et al.*, 2003). Ainda mais especificamente, em relação às infecções bucais praticamente nada é conhecido.

4. PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Nosso objetivo foi testar a hipótese de que as prostaglandinas, produzidas no periodonto em resposta ao LPS, estimulam as aferências nervo trigêmeo e este transmite os sinais da cavidade bucal ao SNC, principalmente para a área pré-óptica do hipotálamo (principal centro termointegrador) na indução da febre. Para tanto, visou-se o delineamento de um modelo que servisse ao estudo das infecções odontológicas que levam a alterações na saúde geral de nossos pacientes, em especial em crianças muito jovens, as quais apresentam sistema imune imaturo.

Baseado nas informações acima, este projeto teve como objetivos:

1. Testar a validade do modelo proposto para o estudo da infecção localizada no periodonto de proteção de ratos com a implantação da cânula de polietileno.
2. Verificar as prováveis mudanças na temperatura corporal de ratos após injeções locais de diferentes doses de LPS no periodonto.
3. Verificar a participação das aferências do nervo trigêmeo na transmissão de sinais da cavidade bucal ao SNC na indução da febre.
4. Verificar a participação das prostaglandinas como o mediador local no periodonto.
5. Verificar se há ativação neuronal no núcleo trigeminal e na POA, após administração de LPS no periodonto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, Rodentia) machos, pesando entre 250 e 300 g no dia do experimento, fornecidos pelo biotério central do campus da USP de Ribeirão Preto – SP. Os animais foram acondicionados em caixas individuais e mantidos a uma temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) com livre acesso a água e ração, em um ciclo claro:escuro 12:12 h, com as luzes se ascendendo às 6:00 h. Para que não ocorram possíveis mudanças na temperatura corporal dos ratos devido as variações circadianas, todos os experimentos tiveram início às 09:00 horas. O estudo foi aprovado e foi conduzido de acordo com os protocolos da Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo N° 04.1.350.53.8).

4.2 CIRURGIA PARA IMPLANTAÇÃO DA SONDA DE BIOTELEMETRIA

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de 2,2,2-tribromoethanol (250 mg/kg). Uma sonda de biotelemetria (Modelo: ER4000; Mini-Mitter Co. Inc., Sunriver, OR) foi colocada na cavidade abdominal dos ratos, através de uma incisão na parede abdominal (laparotomia medial). Após a colocação da sonda, foi realizada a sutura da parede abdominal em dois planos: músculo e pele.

4.3 CIRURGIA PARA IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA DE POLIETILENO NO PERIODONTO DE PROTEÇÃO

Em todos os grupos experimentais, com o animal ainda anestesiado, foi implantada no periodonto de proteção uma cânula de polietileno (PE 10) de 4,5 centímetros de comprimento por 0,28 milímetros de diâmetro (Intramedic Tubing PE 10 – Becton Dickinson), soldada a uma cânula de polietileno (PE 50) de 1,0

centímetro de comprimento por 0,58 milímetros de diâmetro (Intramedic Tubing PE 50 – Becton Dickinson), exteriorizada na região superior do pescoço, entre as orelhas. No ponto de solda foi realizada a sutura da cânula na pele do animal. O aumento de diâmetro da cânula foi realizado para possibilitar a injeção. Após a implantação, a extremidade da cânula localizou-se na região gengival anterior da maxila, simulando um “air pouch” gengival. Um pequeno volume de ar (5 µL) foi injetado através de um filtro de 0.2 µm para delinear o “air pouch”. Foi realizada uma profilaxia antibiótica com penicilina (benzilpenicillin-160,000 U/kg, streptomina-33.3mg/kg e diidroestreptomicina-33.3 mg/Kg, i.m.) e um período de três dias foi aguardado para recuperação cirúrgica do animal. Durante este período a cânula foi mantida fechada com a utilização de um mandril confeccionado com agulha hipodérmica com calibre semelhante ao PE 50. Esta cânula possibilitou a injeção das drogas com o animal consciente, sem necessidade de anestesia no dia do experimento, não gerando estresse ao animal.

4.4 CIRURGIA PARA IMPLANTAÇÃO DE CATETER PARA COLETA DE SANGUE

Em um outro grupo experimental, um cateter adicional, também confeccionado de polietileno (Intramedic Tubing PE 50 – Becton Dickinson) foi implantado na artéria femoral para coleta de sangue, que foi utilizado para dosagem de endotoxina.

4.5 CIRURGIA DE TRANSECÇÃO DO RAMO MAXILAR DO NERVO TRIGÊMEO

Outro grupo de animais foi submetido à cirurgia de transecção bilateral dos ramos maxilares do nervo trigêmeo. Após anestesia com injeção intraperitoneal (i.p.) de 2,2,2-tribromoethanol (250 mg/kg) os nervos foram seccionados pelo seguinte procedimento: incisão de 1 centímetro na pele, acima do arco zigomático, localizando o forame infra-orbital. Exposição do ramo maxilar do nervo trigêmeo, que emerge deste forame. Isolamento do nervo, corte do nervo bilateralmente e sutura da pele do animal. Animais com operação fictícia (“sham”) foram

submetidos ao mesmo procedimento, porém os nervos não foram seccionados. Foram aguardados 7 dias para recuperação cirúrgica do animal.

4.6 MEDIDA DA TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura corporal dos animais foi monitorada continuamente utilizando-se biotelemetria (Mini-Mitter Co. Inc., Sunriver, OR). Os registros foram feitos a intervalos de 5 minutos durante 1 hora antes e cinco horas após a administração das drogas e foram plotados no gráfico a cada intervalo de 15 minutos. A temperatura basal dos animais foi determinada pela média das dez últimas anteriores à injeção das drogas. Os dados foram obtidos e processados em um computador IBM utilizando-se o programa Vital View (Mini-Mitter Co. Inc., Sunriver, OR).

4.7 DROGAS

As drogas utilizadas foram: o LPS de *Escherichia coli* (O111:B4 Sigma, St Louis, MO, EUA), dissolvido em solução salina estéril 0.9% e apirogênica. O LPS foi injetado internamente via cânula de polietileno com seringa Hamilton de 10 µL, nas doses de 10 e 100 µg/kg.

O inibidor não seletivo das ciclooxigenases, diclofenaco de sódio (Calbiochem, LA Jolla, CA), dissolvido em 95% de solução salina e 5% de etanol, e foi injetado na dose de 5 mg/kg.

O anestésico local cloridrato de mepivacaína a 3% (MEPISV-DFL, Jacarepaguá – Rio de Janeiro, Brasil) com composição: 30 mg de cloridrato de mepivacaína, 6 mg de cloreto de sódio e 1,0 mL de água destilada, foi injetado na dose de 1.2 mg/kg.

O volume injetado de LPS foi de 3,5 µL por rato. Previamente à injeção do LPS foi injetado 3,0 µL de ar e após a injeção também foi injetado 3,0 µL de ar, simulando um “air pouch” gengival. A mepivacaína e o diclofenaco foram injetados em volume de 12 µl por rato. Antes e após as injeções das drogas foram injetados 3,0 µL de ar. Todas as drogas foram injetadas via cânula com o auxílio de seringa Hamilton de 10 ou 25 µL. Doses foram escolhidas em experimentos piloto em nosso laboratório e baseados em estudos prévios (Ross *et al.*, 2000).

4.8 COLETA DO PLASMA E DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA

Sessenta minutos após a injeção de LPS (100 µg/kg) no periodonto (via cânula), uma amostra de sangue foi coletada do cateter femoral intra-arterial com seringa estéril e heparinizada e foi imediatamente centrifugado e o plasma separado e mantido a – 70°C até o processamento. As concentrações de endotoxina foram medidas pelo método enzimático, de acordo com o protocolo padronizado por Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. (Walkersville, DM 21793). O limite de detecção do teste de endotoxina é de 10 pg/mL. O tempo para coleta foi selecionado com base em estudos prévios (Ross *et al.*, 2003).

4.9 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

4.9.1. Perfusão transcardíaca e cortes cerebrais: em um outro grupo experimental, animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de Ketamina (ketamina Agener, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xylazina (Dopaser, Calier S. A., Barcelona, Espanha) na dose de 90:10

mg/kg. Este anestésico foi selecionado porque não interfere nos resultados da expressão da proteína *Fos* de acordo com a literatura e com experimentos piloto, sendo o mais utilizado para este fim (Magdalena *et al.*, 2004). Após a anestesia, os animais foram perfundidos transcárdicamente com solução tampão fosfato-salina (PBS 200 mL – pH 7.4), seguidos por paraformaldeído previamente preparado a 4% em tampão fosfato 0.1 M (200 mL – pH 7.4). Os cérebros foram rapidamente removidos e mantidos na mesma solução fixadora por 4 horas (4°C) e depois crioprotetidas por imersão durante a noite em tampão fosfato-sacarose a 30%. Estes cérebros foram congelados em gelo seco, montados em cryostato (Frigocut 2800, Leica, Wetzlar, Alemanha) e cortados em secções coronais de 40 µm, estes cortes foram armazenados a - 20°C em solução crioprotetora (tampão fosfato de sódio 0.05%, pH 7.3, 30% etilenoglicol, 20% glicerol).

4.9.2. Imunohistoquímica para Fos: Cada terceira sessão das áreas de interesse foram processadas para imunohistoquímica para *Fos*. O método selecionado para imunohistoquímica foi o método de “free floating”. Primeiramente os cortes foram lavados por 3 vezes em PBS (0.01 M, pH 7.4) e incubados em PBS contendo 1% de peróxido de hidrogênio por 10 minutos para inativar a atividade das peroxidases endógenas. Após várias lavagens em PBS por 30 minutos, os cortes foram colocados em soro normal de carneiro a 5% (NGS, Vector, Burlingame, CA) por 45 minutos e depois foram incubados por 24-48 horas a 4°C com o soro anti-*c-fos* policlonal obtido de coelhos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). O soro foi diluído (1:1000) em PBS contendo 1% de soro de albumina bovina e 0.5% de triton X-100. Após 3 lavagens em PBS, os cortes foram

incubados por 1.5 horas a temperatura ambiente com o segundo anticorpo biotilado de carneiro (anti-rabbit IgG - 1:400; Vector). Subseqüentemente, eles foram lavados por 3 vezes em PBS e colocados por 30 minutos em um complexo de avitina-biotina peroxidase (kit ABC, Vectastain, Vector, Burlingame, CA). Neurônios marcados foram visualizados após 5 a 10 minutos de incubação com 0.05% de 3,3'-diaminobenzina tetracloride e 0.1% de peróxido de hidrogênio. Os cortes foram novamente lavados e montados em lâminas gelatinizadas, deixados secar durante a noite e no próximo dia desidratados em séries ascendentes de etanol e xilol e em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando-se o Entellan. O anticorpo utilizado neste estudo reconheceu *c-fos* e proteínas relacionadas ao Fos, os neurônios marcados foram descritos como Fos-imunorreativos (FOS-IR). No controle negativo da imunohistoquímica foi omitido o primeiro anticorpo (soro anti-*c-fos* policlonal gerado em coelhos – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

4.9.3. Análise da imunohistoquímica: Os cortes foram analisados por microscopia de luz e neurônios marcados foram registrados com o uso de um sistema de análise de imagens (Keiss KS 300). Para quantificação, um corte cerebral de cada núcleo (subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal e área pré-óptica do hipotálamo) foi selecionado para contagem unilateral para cada rato. Os cortes foram selecionados baseados no Atlas Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1998) e as seções que apresentaram o maior número de células Fos reativas (FOS-IR) foram contadas unilateralmente.

4.10. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.10.1. PROTOCOLO 1

Avaliação do efeito da administração de LPS no periodonto na temperatura corporal de ratos:

As alterações na Tc de ratos foram monitoradas após injeção de LPS internamente na cânula de polietileno implantada no periodonto. O LPS foi diluído em solução salina e de acordo com experimentos pilotos as doses selecionadas foram de 10 e 100 µg/kg. As doses propostas na literatura para ratos são de 100 mg/kg de peso corporal quando injetado internamente em bolha de ar no dorso do animal (Cartmell *et al.*, 2003) e a mesma dose quando injetado intra-peritonealmente (Perotti *et al.*, 1999). O volume final injetado foi de 10 µL (3µL de ar, seguido de 3.5 µL de solução de LPS e finalmente 3.5 µL de ar), utilizando uma seringa Hamilton de 10 µL. A Tc dos animais foi medida durante 1 hora antes da injeção do LPS, em intervalos de 5 minutos, para determinação da temperatura basal. Após a administração do LPS, foi verificada a evolução temporal da temperatura de 5 em 5 minutos, por mais um período de 5 horas. Animais controle receberam injeções do mesmo volume de solução salina a 0,9% internamente na cânula.

4.10.2. PROTOCOLO 2

Dosagem de LPS no plasma de ratos 1 hora após administração local de 100 µg/kg de LPS no periodonto:

Para verificar se o LPS injetado via cânula no periodonto de proteção entraria na circulação sanguínea, amostras de sangue foram coletadas e a concentração de endotoxina foi dosada uma hora após a

injeção de LPS (100 µg/kg). Foi selecionado este tempo após a injeção porque de acordo com a literatura o pico da concentração de LPS no plasma se dá após 1 hora da injeção (Ross, 2003).

4.10.3. PROTOCOLO 3

Avaliação do efeito do anestésico local mepivacaína na febre induzida por LPS no periodonto de ratos:

Para verificar o possível efeito do anestésico local na febre induzida por LPS, as alterações na temperatura corporal de ratos foram monitoradas após injeção (via cânula) no periodonto de ratos de mepivacaína (1.2 mg/kg) sem vasoconstrictor 10 minutos antes da injeção de LPS (100 µg/kg), também via cânula. As doses foram definidas em experimentos pilotos em nosso laboratório. A Tc dos animais foi medida durante 1 hora antes até 5 horas após a injeção das drogas. Animais controle receberam injeções do mesmo volume de veículo da mepivacaína (solução salina estéril e apirogênica) e LPS (100 µg/kg). Para verificar se a ação da mepivacaína era local ou sistêmica, um outro grupo de animais receberam injeção intra-peritoneal (i.p.) de mepivacaína na mesma dose (1.2 mg/kg), injetada em volume de 1 mL/kg, 10 minutos antes da injeção de LPS (100 µg/kg) no periodonto de proteção.

4.10.4. PROTOCOLO 4:

Avaliação do efeito da transecção bilateral dos ramos maxilares do nervo trigêmio na febre induzida por LPS no periodonto de ratos:

Para confirmar a participação do nervo trigêmio na febre induzida por LPS, animais foram submetidos a transecção bilateral dos ramos maxilares do nervo trigêmeo, e uma semana após a cirurgia eles foram injetados com LPS (100 µg/kg)

via cânula no periodonto. Animais “sham” também foram injetados com LPS na mesma dose.

4.10.5. PROTOCOLO 5:

Avaliação do efeito do inibidor não seletivo das ciclooxygenases (diclofenaco de sódio) na febre induzida por LPS no periodonto de ratos:

Para verificar o possível efeito das prostaglandinas locais na febre induzida por LPS, as alterações na temperatura corporal de ratos foram monitoradas após injeção (via cânula) no periodonto de ratos de diclofenaco de sódio (5 mg/kg) 10 minutos antes da injeção de LPS (100 µg/kg), também via cânula. As doses foram definidas em experimentos pilotos em nosso laboratório e de acordo com a literatura (Ross, 2003) e a resposta termoregulatória a dose de 5 mg/kg foi a mais consistente e reprodutível nos protocolos experimentais. A Tc dos animais foi medida durante 1 hora antes até 5 horas após a injeção das drogas. Animais controle receberam injeções do mesmo volume de veículo da diclofenaco (95% de solução salina estéril e apirogênica e 5% de etanol) e LPS (100 µg/kg). Para verificar se a ação do diclofenaco era local ou sistêmica, um outro grupo de animais receberam injeção intra-peritoneal (i.p.) de diclofenaco na mesma dose (5 mg/kg), injetada em volume de 1 mL/kg, 10 minutos antes da injeção de LPS (100 µg/kg) no periodonto de proteção.

4.10.6. PROTOCOLO 6

Verificação e quantificação da expressão de proteína Fos imunorreativa no núcleo trigeminal espinal (caudal, interpolar e oral) e na área pré-óptica do hipotálamo após administração de LPS no periodonto de ratos:

Para verificar a expressão de *c-fos* no núcleo trigeminal espinal e na área pré-óptica do hipotálamo, a dose de 100 µg/kg de LPS foi administrada (via

cânula) no periodonto de ratos e três diferentes tempos de morte foram utilizados: 1, 2 e 3 horas após a injeção. Os cortes cerebrais foram processados para imunohistoquímica e os neurônios imunoreativos foram quantificados.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. Alterações da Tc foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) duas vias para medidas repetidas. A diferença entre as médias foi avaliada pelo teste de múltiplas comparações de Duncan ou pelo teste t para comparar cada ponto. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativamente diferentes.

O índice térmico foi utilizado nos protocolos 1, 3 e 4 para melhor análise dos dados e foi calculado como a área sob a curva abaixo da curva de temperatura ($^{\circ}\text{C h}$). A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) duas vias para medidas repetidas seguidas pelo teste de Duncan. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativamente diferentes.

O número de neurônios Fos-IR foi comparado por análise de variância (ANOVA) uma via para medidas repetidas, seguida por teste de Duncan, com $p < 0.05$ indicando diferença estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1 METODOLOGIA UTILIZADA

Os modelo proposto para simular uma infecção aguda periodontal por LPS em ratos se adaptou muito bem às necessidades do projeto. Este modelo, utilizando-se cânula de polietileno implantada no periodonto, foi padronizado em nosso laboratório e apresentou diversas vantagens, pois possibilitou injeções com volume de droga constante não necessitando de perfuração na gengiva por agulha no momento da injeção (a punção gengival durante a injeção leva a uma perda parcial da droga por refluxo, pois a gengiva de ratos é um tecido friável, e uma parte da droga pode ser perdida pela perfuração da agulha). Uma outra vantagem da metodologia utilizada é que promove o mínimo de estresse ao animal durante a injeção, pois a injeção é realizada com o animal consciente, sem necessidade de anestesia, realizada pelo prolongamento da cânula exteriorizada na região superior do pescoço. Desta forma podemos garantir sempre o mesmo volume e mesma dosagem das drogas utilizadas nos protocolos experimentais e as respostas dos animais não foram alteradas por nenhum estresse durante as injeções.

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERIODONTO NA TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS

A Figura 1 mostra o efeito da injeção de LPS nos tecidos periodontais na temperatura corporal de ratos. As duas diferentes doses de LPS utilizadas (10 µg/kg e 100 µg/kg) levaram a um aumento estatisticamente significativo da temperatura corporal dos animais, caracterizando uma resposta febril, quando comparados com o controle, que receberam injeção de solução salina estéril e apirogênica no periodonto [$F_{(38,247)} = 6.96$, $P = 0.00$]. A dose baixa de LPS (10 µg/kg) elicitou uma febre bifásica, de desenvolvimento mais lento, porém a dose alta de LPS (100 µg/kg) elicitou uma resposta febril mais rápida e em maior intensidade que a menor dose de LPS. Este padrão de resposta caracteriza uma resposta febril dose-dependente.

Podemos observar pela análise do gráfico da Figura 1 que as temperaturas corporais dos animais injetados com LPS, em ambas as doses, começaram a subir por volta de 1.5 a 2 horas após a injeção no periodonto. Nos animais injetados com a maior dose (100 µg/kg), o platô (maior valor médio alcançado pelas médias das temperaturas dos animais do grupo experimental) se deu por volta de 3 horas após a injeção e alcançou um valor médio em torno de 38.7 °C. Nos animais injetados com a menor dose (10 µg/kg) o platô ocorreu somente por volta de 4 a 5 horas e alcançou um valor médio inferior, em média 38.4 °C.

O gráfico em barras da Figura 1 expressa os índices térmicos dos animais descritos acima e foi calculado pela área sob a curva de temperaturas, facilitando a visualização das diferenças entre os grupos ($*p < 0.05$ vs salina).

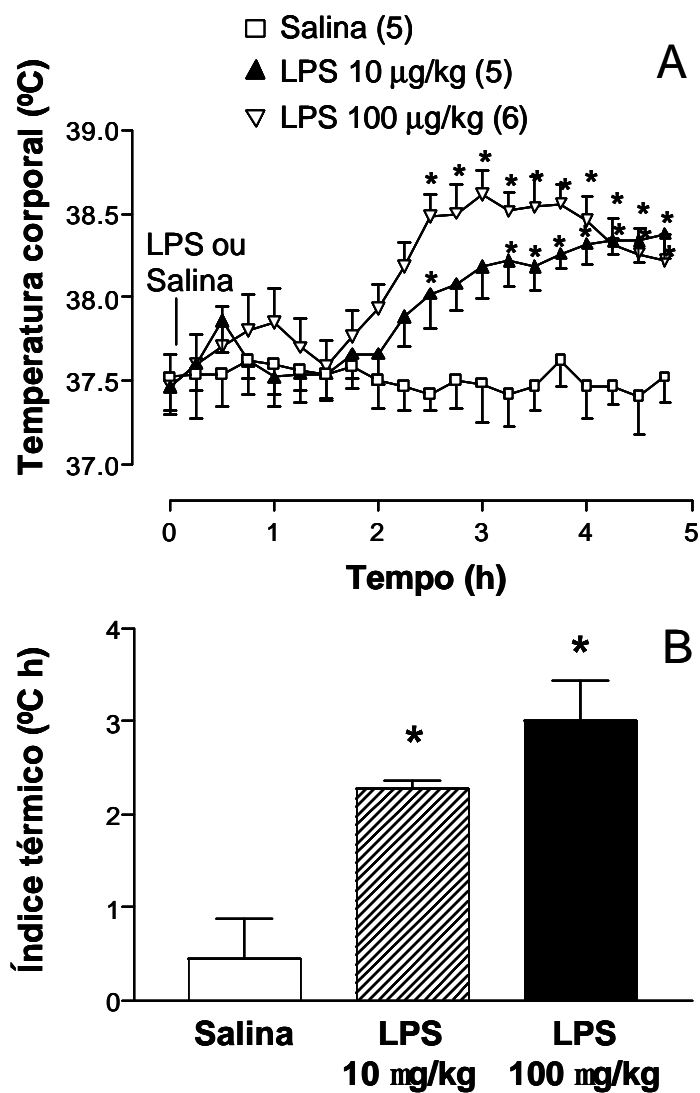


Figura 1: A: Resposta da temperatura corporal de ratos a injeção de solução salina ou LPS (10 e 100 µg/kg) nos tecidos periodontais de proteção. O número de animais por grupo está mostrado entre parênteses (* $p < 0.05$ comparado com o grupo tratado com solução salina). **B:** Índice térmico (área sobre a curva) para tratamentos com salina, LPS 10 µg/kg e LPS 100 µg/kg. Valores estão expressos como média \pm E.P.M. (* $p < 0.05$ vs salina).

4.3 DOSAGEM DE LPS NO PLASMA DE RATOS 1 HORA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE LPS (100 µg/kg) NO PERIODONTO

Para avaliar se o LPS entrou na circulação sistêmica do sítio da injeção, amostras de sangue foram coletadas e processadas para dosagem da concentração de endotoxina. Em dois ratos injetados com LPS (100 µg/kg), pequenas quantidades de endotoxina (54 e 62 pg/mL) foram detectados no plasma sanguíneo. Em todos os outros animais (n=14), a concentração de LPS no plasma foi menor que o limite de detecção do método. Além dos resultados que serão mostrados na Figura 3, estes resultados corroboram a hipótese que a indução da febre causada pela injeção de LPS nos tecidos periodontais é, de fato, devido à ação local de LPS ao invés do escape para a circulação sistêmica.

Tabela 1- Dosagem de LPS no plasma de ratos pelo método enzimático padronizado por Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.

<i>DOSAGEM LPS NO PLASMA</i>	<i>TOTAL = 16 ANIMAIS</i>
<i>14 RATOS (87.5%)</i>	<i>NÃO FOI DETECTADO LPS</i>
<i>2 RATOS (12.5%)</i>	<i>DETECTADO LPS EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES (54 e 62 pg/mL)</i>

4.4 AÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL MEPIVACAÍNA NA FEBRE INDUZIDA POR LPS NO PERIODONTO DE RATOS

A Figura 2 mostra a ação do anestésico local mepivacaína na febre induzida por LPS no periodonto de ratos. O objetivo deste protocolo foi avaliar se a febre induzida por LPS resulta da participação de sinais neurais aferentes do nervo trigêmio. Para este fim ratos foram pré-tratados com o anestésico local mepivacaína nos tecidos periodontais 10 minutos antes da administração de LPS. Animais controle receberam injeção de veículo da mepivacaína e LPS no periodonto.

O pré-tratamento com o anestésico local mepivacaína reduziu significativamente a febre induzida por LPS [$F_{(36,324)} = 2.26$, $P = 0.00$], e esta redução se deu principalmente durante o período de 2 a 4 horas após a injeção. Um outro grupo de animais recebeu a mesma dose de mepivacaína sistemicamente (i.p.) e LPS no periodonto e neste grupo não foram observadas alterações na febre induzida por LPS, indicando que o efeito da mepivacaína na febre induzida por LPS não é devido à ação sistêmica do anestésico e sim a ação local de bloqueio da transmissão dos impulsos neurais aferentes.

O gráfico em barras da Figura 2 expressa os índices térmicos dos grupos experimentais descritos acima e foi calculado pela área sob a curva de temperaturas, facilitando a visualização das diferenças entre os grupos (* $p < 0.05$ vs veículo + LPS).

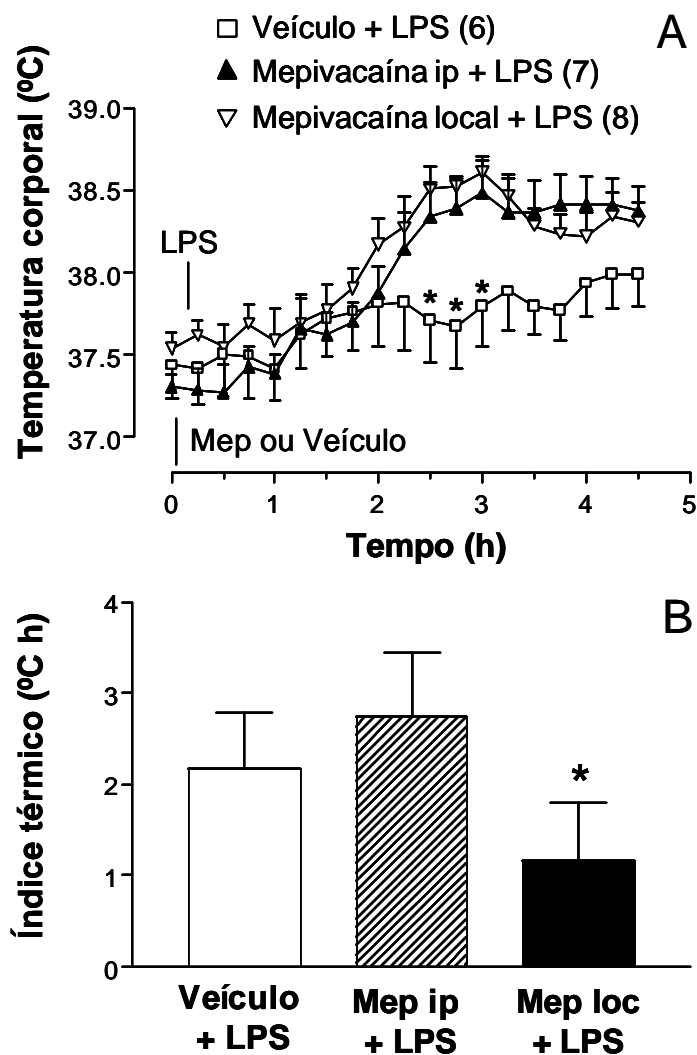


Figura 2: **A:** Efeito da mepivacaína na febre por LPS. **A:** Resposta da temperatura corporal a injeção de mepivacaína local (via cânula no periodonto) ou sistêmica (i.p.) na dose de 1.2 mg/kg 10 minutos antes da injeção de LPS (100 µg/kg) no periodonto de ratos. Animais controle foram injetados com veículo e LPS. O número de animais por grupo está mostrado entre parênteses. (* $p < 0.05$ comparado com o grupo de animais tratados com veículo e LPS). **B:** Índice térmico (área sobre a curva) resume estes resultados. Valores estão expressos como média \pm E.P.M. (* $p < 0.05$ vs veículo + LPS).

4.5 EFEITO DA TRANSECÇÃO BILATERAL DOS RAMOS MAXILARES DO NERVO TRIGÊMIO NA FEBRE INDUZIDA POR LPS NO PERIODONTO DE RATOS

Para confirmar a participação dos sinais neurais aferentes, a febre induzida por LPS foi estudada em um grupo de animais submetidos a transecção bilateral do nervo trigêmio. Animais controle (sham operados) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o nervo não foi seccionado. Os animais experimentais e sham foram injetados com LPS (100 µg/kg) no periodonto e como resultado observou-se que a resposta febril dos animais com nervo trigêmio transeccionados foi significativamente reduzida [$F_{(19,285)} = 9.61$, $P = 0.00$] comparado com os animais sham operados tratados com LPS. Estes resultados estão demonstrados na Figura 3.

O gráfico em barras da Figura 3 expressa os índices térmicos dos grupos experimentais descritos acima e foi calculado pela área sob a curva de temperaturas, facilitando a visualização das diferenças entre os grupos (* $p < 0.05$ vs sham operados + LPS).

Este resultado é também uma evidência de que a febre induzida por LPS é mediada localmente, e por meio de estimulação das fibras do nervo trigêmio.

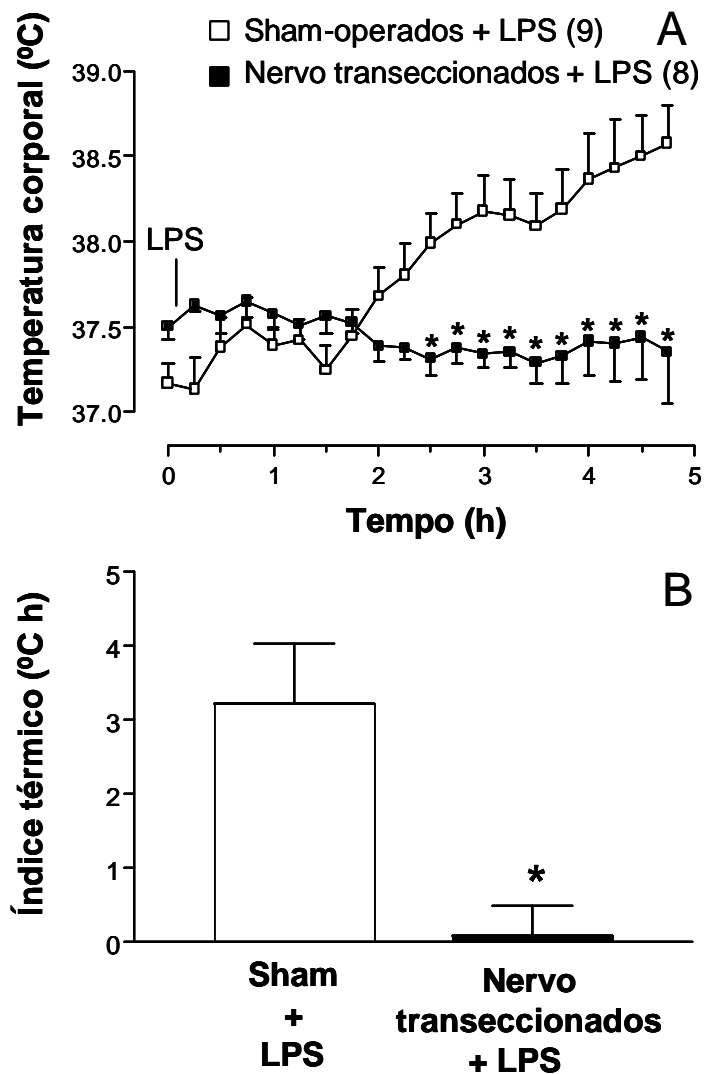


Figura 3: A: Efeito da transecção bilateral do ramo maxilar do nervo trigêmeo na resposta febril induzida por LPS. LPS na dose de 100 µg/kg foi injetado nos tecidos periodontais de proteção de ambos os grupos de ratos: nervo transeccionados e sham operados. (* $p < 0.05$ comparado com o grupo sham operados). **B:** Índice térmico (área sobre a curva) após o tratamento com LPS em ratos sham operados ou com o nervo transeccionados. Valores estão expressos como média \pm E.P.M. (* $p < 0.05$ vs sham operados).

4.6 AÇÃO DO INIBIDOR NÃO SELETIVO DAS CICLOXIGENASES (DICLOFENACO DE SÓDIO) NA FEBRE INDUZIDA POR LPS NO PERIODONTO DE RATOS

Para verificar a função da produção local de prostaglandinas na febre induzida por LPS, animais foram pré-tratados com diclofenaco, que é o inibidor da síntese de prostaglandinas. A pré-injeção de diclofenaco nos tecidos periodontais resultou em uma redução significativa da resposta febril [$F_{(36,270)} = 6.81$, $P = 0.00$] comparado com animais tratados com veículo e LPS. Nos animais pré-tratados com diclofenaco a febre foi praticamente abolida devido à inibição das prostaglandinas pelo efeito do diclofenaco.

Além disto, injeção i.p. de diclofenaco não afetou a febre induzida por LPS, indicando que o efeito do diclofenaco na febre não é devido à ação sistêmica desta droga e sim a sua ação local no periodonto. Estes resultados estão representados na Figura 4.

O gráfico em barras da Figura 4 expressa os índices térmicos dos grupos experimentais descritos acima e foi calculado pela área sob a curva de temperaturas, facilitando a visualização das diferenças entre os grupos (* $p < 0.05$ vs veículo + LPS).

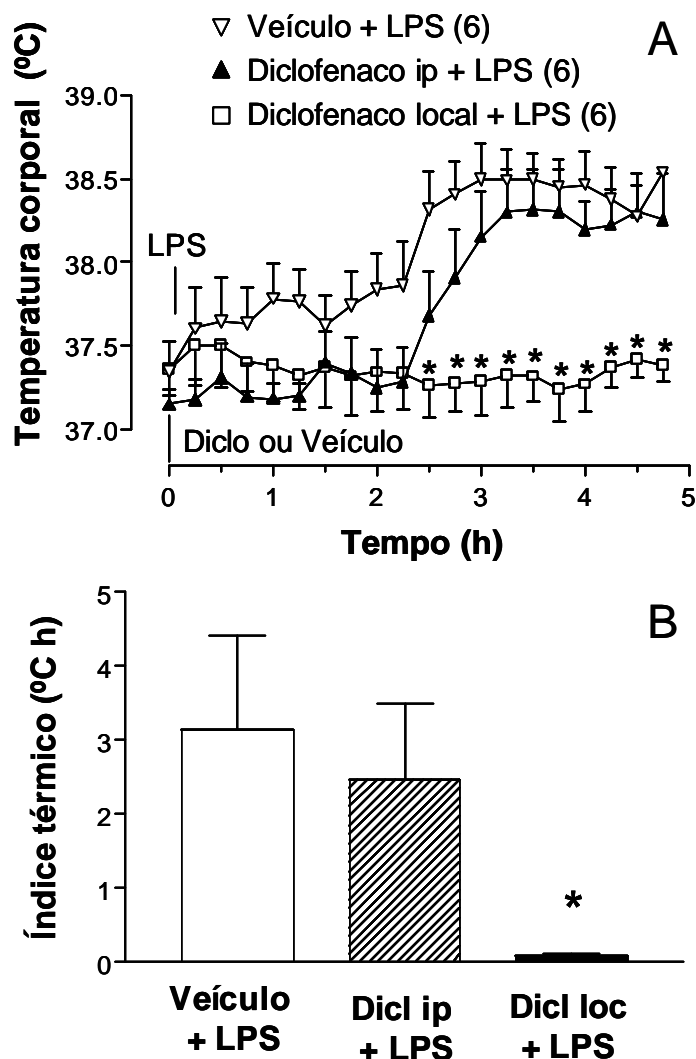


Figura 4: Efeito do diclofenaco na febre induzida por LPS. Resposta da temperatura corporal a injeção de diclofenaco local (via cânula no periodonto) ou sistêmica (i.p.) na dose de 5 mg/kg 10 minutos antes da injeção de LPS (100 µg/kg) no periodonto de ratos. Animais controle foram injetados com veículo e LPS. O número de animais por grupo está mostrado entre parênteses. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (* $p < 0.05$ vs veículo + LPS). **B:** Índice térmico resume estes resultados. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (* $p < 0.05$ vs veículo + LPS).

4.7 VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS IMUNORREATIVA NO NÚCLEO TRIGEMINAL ESPINHAL (CAUDAL, INTERPOLAR E ORAL) E NA ÁREA PRÉ-ÓPTICA DO HIPOTÁLAMO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERIODONTO DE RATOS

Através da técnica de imunohistoquímica foi verificada e quantificada a expressão da proteína Fos, produto do proto-oncogene *c-fos*, que vem sendo amplamente utilizada como marcador de atividade neuronal, nos núcleos trigeminais e na área-pré-óptica do hipotálamo.

No grupo tratado com LPS (100 µg/kg), neurônios Fos positivos foram encontrados bilateralmente no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na área pré-óptica do hipotálamo 2 e 3 horas após a injeção de LPS (Figura 5). No grupo controle (tratados com salina), o número de neurônios Fos positivos foi significativamente menor que o observado no grupo tratado com LPS ($p < 0.05$), nos três diferentes tempos de morte (figuras 5 e 6). No grupo morto uma hora após o tratamento, muito poucos neurônios Fos positivos foram encontrados no subnúcleo caudal e na área pré-óptica do hipotálamo, em ambos os grupos ($p < 0.05$). Além disto, nos subnúcleos oral e interpolar observamos ausência de neurônios marcados. Em relação ao tempo após a injeção, foi observado que 3 horas após o tratamento com LPS o número de neurônios Fos positivos foi significativamente maior que após 2 horas ($p < 0.05$), no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na área pré-óptica do hipotálamo (Figura 6). O controle negativo da imunohistoquímica não revelou nenhum neurônio marcado.

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Súmula dos resultados

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o LPS presente no periodonto de ratos causa febre e que esta resposta febril é dependente de dose. Além disso, mostra também que o nervo trigêmio é responsável pela sinalização aferente ao SNC para induzir a febre, através de uma abordagem farmacológica (com a utilização do anestésico local mepivacaína) e através de uma abordagem cirúrgica (com transecção bilateral do ramo maxilar do nervo trigêmio). Os resultados mostraram também que a febre induzida por LPS resultou de um mecanismo dependente de prostaglandinas, pois o inibidor das COX (diclofenaco) aboliu a febre induzida por LPS. Em uma abordagem mais detalhada, através de imunohistoquímica foi constatada a ativação da área pré-óptica do hipotálamo e do subnúcleo caudal do núcleo trigeminal 2 e 3 horas após a administração de LPS no periodonto, com maior recrutamento neuronal após 3 horas quando comparado com o grupo morto após 2 horas da injeção.

Dos resultados

No presente trabalho, foi injetado LPS localmente nos tecidos periodontais de proteção para verificar a possível indução de febre mediada pelo envolvimento de sinais neurais aferentes periodontais. Os resultados indicam que a injeção local de LPS causa uma resposta febril dose-dependente, pois os animais que receberam injeção de LPS no periodonto na dose mais alta (100 µg/kg) apresentaram uma maior elevação na temperatura corporal que os animais que receberam a dose mais baixa (10 µg/kg). O comportamento dos animais também foi alterado, coincidentemente com o aparecimento da febre, os animais ficaram mais encolhidos e estressados na caixa, manifestando um comportamento de doença.

Para verificar o envolvimento dos nervos trigeminais como um sinalizador aferente ao SNC para induzir a resposta febril, utilizou-se um anestésico local (mepivacaína), como também transecção do nervo trigêmeo em outro grupo

experimental. O nervo trigêmeo (V par craniano) é o principal nervo responsável pela inervação da cavidade bucal, innervando tanto os dentes (polpa), como os tecidos de sustentação dos dentes (gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar). Ambos os tratamentos causaram uma significativa redução na febre induzida por LPS, que suportam fortemente a hipótese que os sinais neurais provenientes da cavidade bucal, que pode ser ativada pelos estímulos inflamatórios, são transmitidos ao SNC para indução da febre pelo nervo trigêmeo.

Na seqüência, esta via foi investigada em mais detalhes. Para este fim, foi combinado o tratamento do LPS (100 µg/kg) com o inibidor local não seletivo das ciclooxigenases (COX), o diclofenaco. Os resultados mostraram que a febre induzida por LPS resultou de um mecanismo dependente de prostaglandinas, desde que o inibidor das COX (diclofenaco) aboliu a febre induzida por LPS. Desta forma concluímos que o mecanismo de sinalização das aferências do nervo trigêmeo é dependente de prostaglandinas, no caso, possivelmente, a prostaglandina E₂ mediador proximal da resposta febril.

Adicionalmente, por meio de investigação de *c-fos*, foi detectada a ativação neuronal no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal após injeção de LPS. Sabe-se que este núcleo possui fibras de passagem do nervo trigêmeo. Além disto, foi detectada expressão de *c-fos* nos neurônios da área pré-óptica do hipotálamo, área conhecida como o centro termointegrador do Sistema Nervoso Central (Steiner *et al.*, 2002, Nagashima *et al.*, 2000, Blatteis e Sehic, 1997 e Kruger, 1991) em resposta a injeção local de LPS no periodonto.

O efeito do anestésico local mepivacaína (atenuação da febre induzida por LPS) parece não ser devido à ação sistêmica da mepivacaína, pois injeção intraperitoneal do anestésico mepivacaína não alterou a resposta febril em ratos (Figura 2). De qualquer forma, é sabido que os anestésicos podem também bloquear uma variedade de canais iônicos (Fozzard *et al.*, 2005), não somente nas células nervosas, mas também nas células inflamatórias (Sinclair *et al.*, 1993) afetando desta forma a função imune (Schmidt *et al.*, 1997). Apesar desta observação, há um forte argumento indicando que o efeito dos anestésicos na função imune não deve estar diretamente relacionada com a redução da resposta febril

observada. Em estudo prévio de Ross *et al.*, (2000), onde o LPS foi injetado localmente nas costas de porcos da Índia (Guinea Pigs), foi mostrado que embora o anestésico local bloqueie a resposta febril, a liberação de interleucina 6 (IL-6) não é prejudicada pelo tratamento com anestésico local (Ross *et al.*, 2000). Novamente, suportando esta evidência é o fato de que a IL-6 tem sido reportada como a única citocina que escapa em quantidades consideráveis do sítio da inflamação local para a circulação sistêmica (Cartmell *et al.*, 1998).

Adicionalmente, foi aplicado um modelo de transecção bilateral dos ramos maxilares do nervo trigêmeo e os resultados foram muito similares ao tratamento com mepivacaína. A transecção do nervo também bloqueou a resposta febril a injeção local (no periodonto) de LPS (Figura 3), novamente confirmando a função do nervo trigêmeo como uma via de sinalização aferente para a inflamação local. De acordo com nosso conhecimento, está foi a primeira vez que este modelo de transecção dos ramos maxilares do nervo trigêmio foi utilizado para interromper a rota de comunicação do sistema imune ao SNC. Os procedimentos cirúrgicos foram feitos em respeito às estruturas anatômicas e não afetou as temperaturas basais dos animais. Da mesma forma, o procedimento cirúrgico não alterou o comportamento dos animais, os quais mantiveram-se normais quanto à alimentação e hidratação durante o intervalo entre a cirurgia e o dia do experimento.

É interessante notar que uma resposta febril evidente foi observada após injeção de LPS nos tecidos periodontais, apesar do fato de que, como regra geral, periodontite crônica não vem acompanhada de febre. Esta discrepância pode ser devida ao fato de este modelo proposto reproduz quadros de periodontite aguda e não de periodontite crônica. De fato, durante a periodontite aguda (abcesso periodontal, por exemplo) microrganismos gram negativos e LPS estão presentes, e em grandes quantidades, e não é surpresa que a febre geralmente seja observada nestes pacientes (Katz *et al.*, 1992, Fukai *et al.*, 1989 e Schroder, 1979).

O SNC participa de funções centrais na coordenação de diversas respostas à inflamação sistêmica, incluindo a febre. Ele traduz os sinais febrígenicos da

periferia e promove ajustes apropriados da atividade termofetora para finalmente aumentar a temperatura corporal. Recentemente, tem sido proposto que mediadores da resposta febril produzidos por células sanguíneas não devem ser a única rota de ativação dos mecanismos febrigênicos, mas fibras aferentes que trafegam pelo nervo vago podem também participar (Blatteis *et al.*, 2000 e Romanovski, 2000). Além disto, a ativação dos nervos cutâneos aferentes por sinais imunes também têm sido sugeridos em terem função na manifestação da resposta febril (Ross *et al.*, 2003, Ross *et al.*, 2000 e Roth *et al.*, 2000). O presente estudo adicionou a este cenário a participação de sinais neurais aferentes originados na cavidade bucal e transmitidos para o SNC pelo nervo trigêmio. Também é conhecido que após ativação de qualquer uma destas vias aferentes, finalmente ocorre um aumento dos níveis de prostaglandina E₂ (o mediador proximal da febre) na área pré-óptica do hipotálamo, que foi consistente com nossos resultados sobre a expressão de *c-fos* por ativação neuronal da POA (Figuras 5 e 6).

A técnica de expressão de *c-fos* tem sido extensivamente utilizada como uma marcadora da atividade neuronal e é induzida por vários estímulos, incluindo estímulo nociceptivo da cavidade bucal, causado pela movimentação dentária em ratos (Magdalena *et al.*, 2004) e inflamação pulpar induzida por LPS em furão (Chattipakorn *et al.*, 2002). A marcação de *c-fos* aparece no núcleo neuronal como uma marcação marrom, delimitando toda a extensão do núcleo. A proteína Fos é produto do proto-oncogene *c-fos* e é produzida no citoplasma do neurônio e transportada ao núcleo, onde forma um complexo ligando-se ao DNA nos sítios ligantes de proteína. No núcleo esta proteína fica armazenada, porém, apresenta uma meia vida relativamente curta, em média de 2 horas (Morgan e Curran, 1989).

No trabalho de Chattipakorn *et al.*, 2002, a expressão de *c-fos*, após injeção de LPS em polpas de furão, foi restrita ao subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal, desta forma similar aos resultados obtidos nos nossos experimentos com injeção de LPS no periodonto de ratos (Figura 5). Muitos estudos têm mostrado que a parte caudal do núcleo trigeminal espinhal, é um importante sítio que retransmite o “input” nociceptivo das estruturas orofaciais (Sessle, 1986), incluindo

da dentição. Além disto, tanto o estímulo nociceptivo como a febre são processos que fazem parte da reação de fase aguda à infecção e a inflamação. No presente estudo, núcleos neuroniais marcados por *c-fos* somente foram detectados nas lâminas superficiais do subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal (lâminas I e II). Da mesma forma, a expressão de *c-fos* em resposta ao LPS pulpar também foi detectado somente nas lâminas superficiais do subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal nas primeiras horas após o estímulo por LPS; núcleos neuroniais marcados por *c-fos* somente foram detectados nas lâminas profundas do subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal (lâminas III e IV) em tempos mais prolongados de exposição da polpa de furão ao LPS. Em comparação, estímulo transiente de dor evoca a expressão de *c-fos* primariamente nas regiões superficiais do subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal (lâminas I e II) (Chattipakorn *et al.*, 2002).

O aumento da temperatura corporal dos ratos após a administração de LPS no periodonto teve início por volta de uma hora e 30 minutos após a administração (Figura 1), ao passo que a expressão de *c-fos* não foi observada após 1 hora da injeção, mas sim após 2 e 3 horas do desafio da endotoxina (Figuras 5 e 6). Estes resultados estão de acordo com Valles *et al.*, 2005 que sugerem que a resposta de *c-fos* a endotoxina parece ser mais lenta e de maior duração que dos outros tipos de agentes estressores, com o pico da expressão de *c-fos* entre 2 a 4 horas após a administração.

As mudanças neuroquímicas e neurofisiológicas induzidas por injúrias aos nervos do sistema trigeminal são claramente distintas daquelas vistas seguidas de lesões de outros nervos periféricos, como recentemente revisado por Fried *et al.*, 2001. Por exemplo, o começo da nocicepção espontânea no caso anterior (sistema trigeminal) é mais demorado (mas pode ser sustentado por relativamente longos períodos) e não está associada com terminais ganglionares simpáticos (Bongenhielm *et al.*, 1999, Tal e Devor *et al.*, 1992). Todavia, o conhecimento atual sobre os mecanismos específicos a respeito da informação mediada pelo trigêmio, não somente por origem inflamatória, mas também neuropática, é ainda notadamente esparsa. A este respeito, o presente estudo provê novos

mecanismos neurofarmacológicos envolvidos com a resposta febril após injeção de LPS nos tecidos periodontais de proteção de ratos, que é inervado pelo sistema trigeminal. Os dados revelados nesta dissertação revelam uma contribuição importante a respeito da inervação da cavidade bucal e da ativação local da COX associada com a febre induzida por LPS.

Após serem infectados por patógenos ou por moléculas patogênicas como o LPS, os animais apresentam várias alterações comportamentais, denominadas de comportamento da doença, que pode incluir: anorexia, adipsia, letargia e redução da sociabilidade (Kluger, 1991), além da febre. Nas últimas décadas, grande progresso tem sido realizado no sentido de se entender os mecanismos da febre, que é considerada como uma marca da doença (Kluger, 1991). Mais recentemente, o nervo vago tem sido citado por participar de uma importante função em mediar o comportamento da doença, sendo um importante aferente sensorial (Blatteis e Sehic, 1997) . O presente estudo provê evidências que os nervos aferentes periodontais podem ser ativados por sinais imunes para mediar a resposta febril e possivelmente outros componentes do comportamento da doença.

Como conclusão, embora existam diferenças entre o sistema trigeminal em relação aos outros nervos periféricos para mediar ambas as informações inflamatórias e neuropáticas (Fried *et al.*, 2001), o estímulo do nervo e a participação das COX para elicitar a febre após injeção local de LPS no periodonto de ratos parece não ser diferente daquela elicitada por LPS em outras partes do corpo.

O conhecimento gerado neste trabalho contribui para o entendimento das vias neurais e mediadores envolvidos quando o equilíbrio entre os microrganismos, em especial as bactérias gram-negativas, que apresentam em sua parede celular o LPS, e cavidade bucal é rompido, gerando quadros de febre e sintomas da doença, muitas vezes com presença de edema e dor. Desta forma, demonstrou-se em modelo animal que uma infecção aguda do periodonto por endotoxina causa manifestações sistêmicas no indivíduo de forma generalizada, com envolvimento de vias neurais, mediadores inflamatórios e também uma

ativação do SNC frente ao ataque bacteriano. A odontologia atual visa entender os mecanismos da doença, para possibilitar a criação de medicamentos e técnicas que sejam biológicas e visem não só a morte bacteriana, mas também a inativação do LPS, que são partículas das bactérias gram-negativas extremamente agressivas aos tecidos vivos, evocando respostas sistêmicas generalizadas e muitas vezes promovendo risco a saúde do indivíduo, principalmente em se tratando de pacientes com a saúde debilitada, crianças de idade precoce e pacientes idosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Abahamson L. Subacute bacterial endocarditis following removal of septic foci. British Medical Journal 1931; 2: 8-9.**

- 2. Aihara H, Okada Y, Tamaki N. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pig hippocampal slices. Brain Res 2001; 2(1-2): 36-45.**
- 3. Alt H, Barker MH. Fever of unknown origin. Journal of the American Medical Association 1930; 94: 1457-61.**
- 4. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N. Engl. J. Med 1997; 336 (15): 1066-71.**
- 5. Bernheim HA, Kluger MJ. Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival. Science 1976; 193 (4249): 237-9.**
- 6. Berry E, Silver J. Pyorrhoea as a cause of pyrexia. British Medical Journal 1976; 2: 1289-90.**
7. Blatteis CM, Sehic E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain. NIPS 1997; 12: 1-9.
- 8. Blatteis CM, Sehic E. Cytokines and fever. Ann N Y Acad Sci 1998; 840: 608-18.**
9. Blatteis CM, Sehic E, Li S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. Clin Infect Dis 2000; 31: 168-177.
10. [Bongenhielm U, Boissonade FM, Westermark A, Robinson PP, Fried K.](#) Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. Pain 1999; 82(3): 283-8.
- 11. Borowsky SA, Hasse A, Wiedlin R, Lott E. Dental infection in a cirrhotic patient. Gastroenterology 1979; 76: 836-9.**
- 12. Boulant JA. Hypothalamic neurons: mechanism of sensitivity to temperature. Ann N Y Acad Sci 1998; 856: 108-15.**
- 13. Boulant JA. Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. Clin Infect Dis 2000; 31: S157-61.**

14. Boulant JA, Hardy JD. The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J Physiol* 1974; 240(3): 639-60.
15. Boyd DL, Katz V, Fertik GS, Offenbacher S. Relationship between periodontal disease status and birth outcome. *Journal of Dental Research* 1994; 73: 394.
16. Bryant RE, Hood AF, Hood CE, Loenig MG. Factors affecting mortality of gram-negative rod bacteremia. *Arch Intern Med* 1971; 127(1) 120-8.
17. Byers MR, Dong WK. Comparison of trigeminal receptor location and structure in the periodontal ligament of different types of teeth from the rat, cat and monkey. *J Comp Neurol* 1989; 279(1): 117-27.
18. Cabanac M. Thermiatics and behavior. In: Blatteis CM (ed), *Physiology and Pathophysiology of temperature regulation*, World Scientific, New Jersey, USA. 1998; 108-24.
19. Cartmell T, Ball C, Bristow AF, Mitchell D, Poole S. Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-induced and *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in rats. *Journal Physiology* 2003; 549(2): 653-64.
20. Chattipakorn SC, Sigurdsson A, Light AR, Narhi M, Maixner W. Trigeminal c-fos expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. *Pain* 2002; 99: 61-69.
21. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274(16): 10689-92.
22. Coimbra F, Coimbra A. Dental noxious stimulation reaches the subnucleus caudalis of the trigeminal complex in the rat, as shown by c-fos expression upon thermal or mechanical stimulation. *Neurosci Lett* 1994; 173: 201-4.
23. Daland J. Focal sepsis. *New York Medical Journal* 1916; 103: 1159-60.
24. Dejours P. Factors of energy expenditure. In: DEJOURS, P. (ed), *Principles of comparative respiratory physiology*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, NY, USA 1981; 1-12.

25. Deleo AA, Schoenknecht FD, Anderson MW, Peterson JC. The incidence of bacteremia following oral prophylaxis on pediatric patients. *Oral Surgery. Oral Medicine and Oral Pathology* 1979; 37: 36-45.
26. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM. New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis* 1988; 10(1): 168-89.
27. Downing JF, Taylor MW, Wie KM, Elizondo RS. In vivo hyperthermia enhances plasma antiviral activity and stimulates peripheral lymphocytes for increased synthesis of interferon gamma. *J Interferon Res* 1987; 7(2): 185-93.
28. Eisenbud L. Subacute bacterial endocarditis precipitated by non surgical dental procedures. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology* 1962; 15: 624-7.
- 29. Elmquist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey, WF, Dewitt D, Saper CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* 1997; 381: 119-29.**
- 30. Fozzard HÁ, Lee PJ, Lipkind GM. Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels. *Curr Pharm Des* 2005; 11(21): 2671-86.**
31. Fried K, Bongenhielm U, Boissonade FM, Robinson PP. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. *Neuroscientist* 2001; 7(2): 155-65.
- 32. Fukai K, Kato M, Mikami I, Otaki K, Hasegawa A, Seki N, Takagi M, Katagiri M. Case report of periodontal disease with periodic neutropenia. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi* 1989; 31(4): 1242-53.**
- 33. Garibaldi JA. Influence of temperature on the biosynthesis of iron transport compounds by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1972; 110(1): 262-5.**
34. Geiger AJ. Relation of fatal subacute bacterial endocarditis to tooth extraction. *Journal of the American dental Association* 1942; 29: 1023-5.
35. Gilmer TL. A clinical and experimental study of chronic alveolar abscess in relation to systemic disorders. *Dental Cosmos* 1916; 58: 1357-62.
- 36. Goadby KW. The association of disease of the mouth with rheumatoid arthritis and certain other forms of rheumatism. *Lancet* 1911; 1: 639-49.**

37. Grieger TS, Kluger MJ. Fever and survival: the role of serum iron. J Physiol Lond 1978; 279: 187-96.

38. Hasday JD, Garrison A. Antipyretic therapy in patients with sepsis. Clin Infect Dis 2000; 31: S234-41.

39. Hedstrom SA, Nord CE, Ursing B. Chronic meningitis in patients with dental infection. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 1980; 12: 117-21.

40. Heron I, Berg K. The actions of interferon are potentiated at elevated temperature. Nature Lond 1978; 274: 508-10.

41. Hinkle PM, Lewis DG, Greer TL. Thyrotropin-releasing hormone-receptor interaction in GH3 pituitary cells. Endocrinology 1980; 106(3): 1000-5.

42. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR 4)-deficient mice are hyposponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. J Immunol 1999; 162(7): 1749-52.

43. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. Nature 1987; 328: 632-4.

44. Hunter W. The coming of age of oral sepsis. British Medical Journal 1921; 1: 859.

45. Kanosue K, Yanase-Fujiwara M, Hosono T. Hypothalamic network for thermoregulation and vasomotor control. Am J Physiol 1994; 267: R283-8.

46. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. Annu Rev Immunol 2000; 18: 621-63.

47. Katz J, Weinstein E, Barak S, Livneh A. Dental disease in the differential diagnosis of fever of unknown origin. Annals of Dentistry 1992; 51: 3-5.

48. Kluger MJ. Fever: Role of pyrogens and cryogens. Physiol Rev 1991; 71(1): 93-127.

49. Kluger MJ, Ringler DH, Anver MR. Fever and survival. Science 1975; 188(4184): 166-8.

50. Kurimoto T, Tachibana C, Suzuki M, Watanabe T. Biological and chemical characterization of lipopolysaccharide from *Selenomonas* spp. In human periodontal pockets. *Infect Immun* 1986; 51(3): 969-71.
51. Latronica RJ, Shukes R. Septic emboli and pulmonary abscess secondary to odontogenic infection. *Journal of oral Surgery* 1973; 31: 844-7.
52. Lazarov NE. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 2001; 66: 19-59.
53. Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci* 2004; 12: 93-8.
54. Levinson SL, Barondess JA. Occult dental infection as cause of fever of obscure origin. *American Journal of Medicine* 1979; 66: 463-7.
55. Mackowiak PA, Browne RG, Southern PM, Smith JW. Polymicrobial sepsis: an analysis of 184 cases using log linear models. *Am J Med Sci* 1980; 280(2): 73-80.
56. Magdalena CM, Navarro VP, Park DM, Stuani MBS, Rocha MJA. c-fos expression in the rat brain nuclei following incisor tooth movement. *J Dental Res* 2004; 83: 50-54.
57. Matthews B. Autonomic mechanisms in oral sensation. *Proc Finn Dent Soc* 1989; 85: 365-73.
58. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CAJR. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2(2): 253-8.
59. Menetrey D, Basbaum AI. Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. *J Comp Neurol* 1987; 255(3): 439-50.
60. Meurman JH. Dental infections and general health. *Quintessence International* 1997; 28: 807-11.

61. Miller AJ, Luheshi GN, Royhwell NJ, Hopkins SJ. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *American Journal Physiology* 1997; 272: R857-61.

62. Milton AS. Thermal physiology: briefly history and perspectives. In: Blatteis CM (ed), *Physiology and Pathophysiology of temperature regulation*, World Scientific, New Jersey, USA 1998; 3-11.

63. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *TINS* 1989; 12(11): 459-62.

64. Murray CA, Saunders WP. Root canal treatment and general health; a review of the literature. *International Endodontic Journal* 2000; 33: 1-18.

65. Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci* 2000; 85(1-3): 18-25.

66. Nahas GG, Tannieres ML, Lennon JF. Direct measurement of leukocyte motility: effects of pH and temperature. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 138(1): 350-2.

67. Nakamura M, Ferreira SH. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 1987; 135(2): 145-52.

68. Navazesh M, Muligan R, Sobel S. Toxic shock and Down Syndrome in a dental patient: a case report and review of the literature. *Special Care in Dentistry* 1995; 15: 11-9.

69. Offenbacher S, Katz V, Fertik GS, Collins JG, Boyd DL, Maynor GB. Periodontal infection as a risk factor for pre-term low birth weight. *Journal of Periodontology* 1996; 67: 1103-13.

70. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press 1998.

71. Perotti CAA, Nogueira MS, Antunes-Rodrigues J, Cárnio EC. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(11): 1381-7.

72. Petersdorf RG, Beeson P. Fever of unexplained origin: a report of 100 cases. *Medicine* 1961; 40: 1-30.

73. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 635-700.

74. Rietschel ET, Brade H. Bacterial Endotoxins. *Scientific American* 1992; 26-33.
75. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di-Padova F, Schreier M, Brade H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; 8(2): 217-25.
76. Rise E, Smith JF, Bell J. Reduction of bacteremia after oral manipulations. *Archives of Otolaryngology* 1969; 90: 198-201.
77. Romanovsky AA. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. *Auton Neurosci* 85(1-3): 39-48, 2000.
78. Ross G, Hubschle T, Pehl U, Braun HA, Voigt K, Gersberger R, Roth J. Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* 2003; 94(4): 1395-402.
79. Ross G, Roth J, Storr B, Voigt K, Zeisberger E. Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of the LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. *Physiology & Behavior* 2000; 71: 305-13.
80. Roth J, Storr B, Martin D, Voigt K, Zeisberger E. The role of local induction of Tumor Necrosis Factor by LPS within a subcutaneous air pouch in the febrile response in Guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7: 169-76.
81. Saper CB, Breder CD. The neurologic basis of fever. *New Eng J Med* 1994; 330(26): 1880-6.
82. Schmidt W, Schmidt H, Bauer H, Gebhard MM, Martin E. Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology* 87: 617-624, 1997.
- 83. Schroder H. Therapeutic and diagnostic problems of generalized acute suppurative periodontitis marginalis profunda. *Dtsch Zahnarztl Z* 1979; 34(6): 504-10.**
- 84. Sconyers JR, Crawford JJ, Moriarty JD. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. *J of the Amer Dental Association* 1973; 87: 616-22.**
85. Sessle BJ. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J Endod* 1986; 12: 435-44.

- 86. Shinoda T, Mizutani H, Kakeda T, Suzuki M. Fever of unknown origin caused by dental infection. Oral Surg Oral Med and Oral Pathol 1987; 64: 175-8.**
- 87. Siminoski K. Persistent fever due to occult dental infection: case report and review. Clinical Infectious Diseases 1993; 16: 550-4.**
- 88. Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anesthetics on stimulus induced human leukocyte metabolic activation, LTB₄ release and IL-1 secretion. Acta Anaesthesiol Scand 1993; 37: 159-65.**
- 89. Steiner AA, Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Branco LG. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. American J Physiol 2002; 282: 584-93.**
- 90. Steiner AA, Branco LG. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. J Thermal Biology 2001; 26: 324-30.**
- 91. Szelényi Z, Székely M. Comparison of the effector mechanisms during endotoxin fever in the adult rabbit. Acta Physiol Hung 1979; 54(1): 33-41.**
92. Takahashi Y, Smith P, Ferguson A, Pittman QJ. Circumventricular organs and fever. Am J Physiol 1997; 273: R1690-5.
93. Tal M, Devor M. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. Brain 1992; 115: 148-51.
94. Thompson HM. Ocular changes in relation to dental sepsis. Dental Cosmos 1925; 67: 649-54.
95. Tilders FJ, Derijk RH, Vandam AM, Vincent VA, Schotanus K, Persons JH. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. Psychoneuroendocrinology 1994; 19: 209-32.
96. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. J Biol Chem 1989; 264(18): 10867-71.
97. Valles A, Marti O, Armario A. Mapping the areas sensitive to long-term endotoxin tolerance in the rat brain: a c-fos mRNA study. J Neurochemistry 2005; 93: 1177-88.

98. Van Dyke TE, Dowell VR, Offenbacher S, Snyder W, Hersh T. Potential role of micro-organisms isolated from periodontal lesions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Infection and Immunology* 1986; 53: 671-7.
99. Van-Oss CJ, Absolom DR, Moore LL, Park BH, Humbert JR. Effect of temperature on chemotaxis, phagocytic engulfment, digestion on O₂ consumption of human polymorphonuclear leukocytes. *J Reticuloendothel Soc* 1980; 27(6): 561-5.
100. Van-Velzen SKT, Abraham-Inpijin L, Moorer WR. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *Journal of Clinical Periodontology* 1984; 11: 209-20.
101. Vaughn LK, Veale WL, Cooper KE. Antipyresis: its effect on mortality rate of bacterially infected rabbits. *Brain Res Bull* 1980; 5(1): 69-73.
102. Wasserstrom JA, Vites AM. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd²⁺ concentration and temperature. *Am J Physiol* 1999; 277(2): H488-98.
103. Weinstein MP, Iannini PB, Stratton CW, Eickhoff TC. Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. *Am J. Med* 1978; 64: 592-8.
104. Wensch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, Graninger W. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analog* 1996; 82(4): 810-6.
105. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7(6): 837-47.
106. Werner J. Biophysics of heat exchange between body and environment. In BLATTEIS, C. M. (ed), *Physiology and Pathophysiology of temperature regulation*, World Scientific, New Jersey, USA 1998; 25-45.
107. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249(4975): 1431-3.
108. Zeisberger E, Roth J. Tolerance to pyrogens. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 856: 116-31.

ANEXOS

ANEXO 1 – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA

New role of trigeminal nerve as a thermoafferent neuronal pathway signaling brain in acute periodontitis: participation of local prostaglandins

Valeria P. Navarro¹, Mamie M. Iyomasa¹, Christie R.A. Leite-Panissi¹, Maria C. Almeida² and Luiz G. S. Branco¹

¹Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14040-904, Brazil; ²Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14049-900 Brazil

Running head: Periodontal prostaglandins, trigeminal nerve and fever.

Corresponding author: Luiz G. S. Branco: Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: 55 16 633-0999. E-mail: branco@forp.usp.br

ABSTRACT

Systemic induction of cytokines and prostaglandins plays a key role in the development of fever. However, whether fever is triggered by local injection of LPS and the involvement of locally-produced prostaglandins in periodontal tissue has never been assessed. We tested the hypothesis that trigeminal nerve is a thermoafferent neuronal pathway that signals the brain during acute periodontitis, and this response involves prostaglandins induction. Rats were given a gingival intra-pouch injection of sterile saline or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), at doses of 10 and 100 µg/kg. Some animals were pre-treated with the local anesthetic mepivacaine or had the maxillary trigeminal nerves transected. Another group of animals were pre-treated with the non-selective inhibitor of cyclooxygenases diclofenac. Body core temperature (T_b) was measured by means of biotelemetry before and after injections. LPS elicited a dose dependent increase in T_b , which was abolished by mepivacaine, bilateral transection of the maxillary trigeminal nerve and diclofenac. The results indicate that there is an activation of periodontal nerves to induce fever by LPS. Also, it shows that local formation of prostaglandins plays a role in fever development. Moreover, immunohistochemistry detected *c-fos* expression in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area (POA) of hypothalamus two and three hours after LPS injection, further confirming the role of trigeminal nerve signaling brain in acute periodontitis.

KEY WORDS: fever; diclofenac; periodontal; trigeminal nerve; lipopolysaccharide.

INTRODUCTION

Fever is a multimediated process that is part of the acute-phase reaction to infection and inflammation, being characterized by an elevation in body core temperature (T_b) (18). It is currently accepted that fever results from *de novo* synthesis of protein mediators, especially the cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and of mediators derived from lipid metabolism, which is the case for prostaglandin E_2 (PGE $_2$) (1). These signals from the periphery may gain access to the brain by three routes: (a) via afferent fibers that travel mostly through the vagus nerve and make their first synapse in the nucleus of the solitary tract (2, 27); (b) via circumventricular organs, such as the *organum vasculosum laminae terminalis* and the subfornical organ, which lack a blood-brain barrier (2, 39); and (c) via interaction with cells located in the blood-brain interface, i.e. endothelial (6, 41) and perivascular (32, 11) cells. Activation of these afferent pathways ultimately increases the level of PGE $_2$ in the brain (1); endothelial cells have been reported to play an essential role in the PGE $_2$ production (31, 12, 10, 44). By interacting with EP3 receptors (25, 42) and

consequently decreasing the intracellular level of cyclic AMP in preoptic neurons (38, 37), PGE₂ triggers an appropriate thermoeffector response to increase T_b.

However, fever and other brain mediated sickness responses may also occur in the absence of a substantial raise in the circulating levels of these cytokines, when stimulation of peripheral sensory nerves transport signals of the activated immune system to the brain (28). To study this phenomenon, an experimental fever model has been employed in which lipopolysaccharide (LPS) is administered not systemically but locally into a subcutaneous air pouch in the back of rodents (sometimes combined with a subcutaneous implanted Teflon chamber) that does not lead to LPS appearance in the circulation (30). This approach, which has never been applied in periodontium, contrasts to intraperitoneal or intravenous injection of LPS, which nicely mimics systemic infection.

Somatosensory innervations of the face and oral cavity in mammals is provided by ophthalmic, maxillary and mandibular divisions of the trigeminal nerve (19, 5). There is strong evidence supporting that the anatomical and physiological consequences of nerve injuries of the trigeminal system differ from those seen after peripheral nerve injury (15). Additionally, in humans, craniofacial pain also shows some differences from those involving spinal nerves (13, 21, 22, 24, 35, 8). Nevertheless, possible differences between the roles played by inflammatory mediators following injury of peripheral and trigeminal nerve system have not been assessed. Therefore, the aim of the present study was to test the hypothesis that LPS induces fever when injected locally in the periodontal tissue by activating afferent trigeminal nerve and that the well-established mediator PGE₂ takes part in this response. We also assessed *c-fos* expression in the spinal trigeminal nucleus (including the subnucleus caudalis, interpolaris and oralis) and in the preoptic area (POA) of hypothalamus two and three hours after LPS injection to further confirm the role of trigeminal nerve signaling the brain in acute periodontitis.

METHODS

Animals. Experiments were performed on male Wistar rats weighing 280-310 g at the time of the experiments. All rats were maintained in individual plastic cages, with controlled ambient temperature (25.0 ± 1.0°C) and 12:12h light-dark cycle, (lights on at 6:00 AM). The animals had free access to water and food. Experiments were performed between 8:00 AM and 4:00 PM. The study was conducted in compliance with the guidelines of the American Physiological Society, and with the approval of the University of São Paulo Animal Care and Use Committee (Protocol # 04.1.350.53.8).

Surgery. All surgical procedures were performed in rats anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) and protected with antibiotic (benzylpenicillin – 160,000 U/kg, Streptomycin – 33.3 mg/kg, and Dihydrostreptomycin – 33.3 mg/kg, i.m.). All animals were chronically implanted with a gingival catheter (4.5 cm of polyethylene tubing – PE10) connected to 1 cm of a PE-50 (Clay Adams, Parsippany, NJ) for injection of drugs in the periodontal protection tissue. The catheter was inserted in the vestibular anterior maxilla. A

small volume of air (~5 μ L) was injected through a 0.2 μ m filter to delineate a pouch. The catheter was tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck to be connected to a needle under conscious, freely moving conditions at the moment of the injection. In animals designated for experiments involving T_b measurements, a miniature battery-operated temperature-sensitive transmitter (model: ER-4000, Mini-Mitter Co, Inc., Sunriver, OR, USA) was implanted through a medial laparotomy. Rats assigned for blood sample collection had an additional catheter placed into the femoral artery. Another group of animals had the maxillary trigeminal nerves bilaterally transected. This procedure involved a 1-cm incision in the skin, above the zygomatic arc, to locate the infra-orbital foramen and to expose the maxillary division of the trigeminal nerve. Next, it was isolated and cut bilaterally. The wound was cleansed and closed with sutures. Sham operations were performed in the same way but without cutting the nerves.

Body temperature measurements. For all protocols, T_b was measured by biotelemetry (Mini-Mitter, Sunriver, OR) at 5-min intervals and plotted at 15-min intervals, during a period of 30 min before and 5 h after the treatments. Data were acquired and fed to an IBM computer by using the Vital View software (Mini-Mitter, Sunriver, OR).

Drugs. LPS derived from *Escherichia coli* (O111:B4 Sigma Chemical, St. Louis, MO) was dissolved in sterile 0.9% sodium chloride (saline). LPS was injected locally at a dose of 10 and 100 μ g/kg. The cyclooxygenases (COX) non-selective inhibitor diclofenac-sodium (Calbiochem, La Jolla, CA) was dissolved in 95% sterile saline and 5% ethanol, and injected at a dose of 5 mg/kg. The local anesthetic mepivacaine chloride were purchased as 3% solution (30 mg/mL) dissolved in pyrogen-free saline (MEPISV-DFL, Jacarepaguá - Rio de Janeiro, Brazil) and it was injected at a dose of 1.2 mg/kg. Doses were chosen on the basis of pilot experiments from our laboratory and of a previous study (29).

Plasma collection and measurement of endotoxin. Sixty minutes after LPS injection (100 μ g/kg), a blood sample was drawn from the intra-arterial catheter into sterile heparinized syringe. It was immediately centrifuged and the plasma kept at -70°C until assayed. Endotoxin levels were measured by an enzymatic assay, according to the procedure outlined by Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. (Walkersville, DM 21793). The detection limit of the endotoxin assay is 10 pg/mL. Timing was chosen on the basis of a previous study (28).

Histological procedures. Transcardiac perfusion and brain sectioning: animals were anesthetized intraperitoneally with a mixture of Ketamine (Ketamina Agener, Embu-Guaçu, São Paulo, Brazil) and Xylazine (Dopaser, Calier S.A., Barcelona, Spain) at a dose of 90:10 mg/kg. Once anesthetized, they were perfused transcardially with phosphate buffered saline (PBS, 200 mL- pH 7.4) followed by freshly prepared ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (200 mL – pH 7.4). The brains were rapidly removed and soaked in the same fixative solution for 4 h (4°C) and then cryoprotected by overnight soaking in 30% sucrose-phosphate buffer. They were frozen in dry ice, mounted onto a cryostat (Frigocut 2800, Leica, Wetzlar, Germany) and cut into 40 μ m coronal

sections, which were collected in cryoprotectant solution (0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, 30% ethyleneglicol, 20% glycerol) and stored at -20°C.

Fos Immunohistochemistry: every third section was processed for Fos immunohistochemistry. Free-floating sections were washed in PBS (0.01 M, pH 7.4) and incubated in PBS containing 1% hydrogen peroxide for 10 min to inactivate endogenous peroxidase activity. After several rinses in PBS for 30 min, the sections were placed in 5% normal goat serum (NGS, Vector, Burlingame, CA) for 45 min and then incubated for 24-48 h at 4°C with polyclonal anti-*c-fos* serum generated in rabbits (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The serum was diluted (1:1000) in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.5% triton X 100. After being rinsed in PBS, the sections were incubated for 1.5 h at room temperature with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:400; Vector). Subsequently, they were washed in PBS and placed for 30 min in avidin-biotin peroxidase complex (ABC kit, Vectastain, Vector, Burlingame, CA). Labeled neurons were revealed by a 5 to 10 min incubation with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride and 0.1% hydrogen peroxide. The polyclonal anti-*c-fos* antibody was omitted in negative controls. Sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated through an ascending ethanol series, xylene-cleared, and coverslipped with Entellan. Since the antibody used in this study recognizes *c-fos* and Fos-related proteins, immunoreactive neurons are described as Fos-like immunoreactive (Fos-IR).

Fos Immunohistochemistry Analysis: The sections were analyzed by light microscopy, and labeled neurons were registered with the use of an image analysis system (Keiss KS 300). For quantification, one brain section of each nucleus (subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and preoptic area of hypothalamus) was selected for unilateral counts for each rat. Sections were selected based on Paxinos and Watson Atlas (26) and the section that had the largest number of FOS-IR cells were counted unilaterally, using a computerized image analysis system (NIH System, Image J). Adobe Photoshop (San Jose, CA) was used to enhance the contrast to the images.

Experimental Protocols:

Periodontal Injection Procedure: All injections into the periodontium were made with the use of a 10 µL or 25 µL Hamilton syringe. LPS was injected at a volume of 10 µL/kg (~3 µL/animal); LPS solutions of 1 and 10 mg/mL were used to achieve final doses of 10 and 100 µg/kg, respectively. Mepivacaine and diclofenac were injected at a volume of 40 µL/kg (~12 µL/animal); mepivacaine and diclofenac solutions of 30 and 125 mg/mL were used to achieve final doses of 1.2 and 5 mg/kg, respectively. Before the injection of each drug a volume of ~3 µL of air was injected through the catheter to delineate a pouch.

1- Local injection of LPS and fever: this experiment aimed at testing whether LPS (10 or 100 µg/kg) would cause fever when injected locally, via the gingival catheter, into the periodontal protection tissue. Control rats were injected with pyrogen-free saline (vehicle) instead of LPS. T_b was measured during a period of 5 h after injection.

2- *Determination of the effect of the mepivacaine on LPS fever:* to verify the possible effect of local anesthetic on LPS-induced fever, animals were injected via the gingival catheter, as described above, with mepivacaine (1.2 mg/kg). 10 min after the treatment with mepivacaine, animals received a periodontal injection of LPS (100 µg/kg). Control animals were injected with saline instead of mepivacaine. To verify if mepivacaine blocks fever by acting locally or systemically, another group of animals received an i.p. injection of the same dose of mepivacaine (1.2 mg/mL, injected at a volume of 1 mL/kg) 10 min before the periodontal injection of LPS (100 µg/kg).

3- *Determination of the effect of bilateral transection of trigeminal maxillary nerves:* to confirm the participation of the trigeminal nerve on LPS-induced fever, animals were submitted to a bilateral transection of trigeminal maxillary nerve, and a week after the surgery they were injected with LPS into the periodontium (100 µg/kg). Sham-operated animals were also injected with LPS (100 µg/kg).

4- *Determination of the effect of the diclofenac on LPS fever:* to verify the possible effect of local prostaglandins on LPS fever, animals were injected, via the gingival catheter, into the periodontium with diclofenac (5 mg/mL). 10 min after the treatment with diclofenac, animals received a periodontal injection of LPS (100 µg/kg). Control animals received periodontal injections of vehicle (5% ethanol in saline) followed by LPS (100 µg/kg). The diclofenac dose was used based on a previous study (28) and because, when preliminary doses of diclofenac were tested, the thermoregulatory response to the dose of 5 mg/kg was the most consistent and repeatable in our experimental protocols. To verify if diclofenac blocks fever by acting locally or systemically, another group of animals received an i.p. injection of the same dose of diclofenac (5 mg/kg, injected at a volume of 1 mL/kg) 10 min before the periodontal injection of LPS (100 µg/kg).

5- *Verification and quantification of the expression of immunoreactive Fos protein in the spinal trigeminal nucleus (caudal, interpolaris and oralis subnuclei) and in the preoptic area of hypothalamus after LPS administration on the periodontium:* to verify the expression of *c-fos* in the spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area, a dose of 100 µg/kg LPS was administered (via-catheter) into the periodontium of rats and three different times of killing was used: 1, 2 and 3 h after injection. The brain sections were processed for immunohistochemistry and immunoreactive neurons were quantified.

Statistical analysis. All values are reported as means ± SEM. The thermal response to administration of LPS alone or along with pharmacological treatments or vehicle, was compared by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, followed by Duncan's post-hoc test or by t-test to compare each point. Values were considered significantly different when $P < 0.05$. Thermal Indexes were used in figures 1 – 3 to improve data analysis and were calculated as areas under the T_b curves (°C h). Statistical analyses were performed on these data using ANOVA followed by Duncan's post-hoc test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Number of Fos-IR neurons was compared by one-way

analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, followed by Duncan's post-hoc test, with $P < 0.05$ indicating a significant difference.

RESULTS

Fig. 1 shows the effect of injection of LPS into the periodontal tissues on T_b . The low dose (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of LPS elicited a slowly-developing, biphasic fever, whereas the high dose (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of LPS caused a long-lasting fever compared with saline ($F_{38,247} = 6.96$; $p < 0.05$).

To address whether the LPS-induced fever resulted from the participation of afferent neural signals, rats were pre-treated with the local anesthetic mepivacaine in the periodontal tissues. Pretreatment with local mepivacaine significantly reduced LPS-induced fever ($F_{36,324} = 2.26$; $p < 0.05$), mainly during the period from 2 to 4 h. I.p. injection of mepivacaine, did not alter LPS-induced fever, indicating that the effect of mepivacaine in LPS-induced fever is not to be due to a systemic action of the anesthetic. These data are depicted in Fig. 2.

To confirm the participation of afferent neural signals, LPS-induced fever was studied in a group with bilateral trigeminal nerves transections. The febrile response in trigeminal nerves transected animals was blunted ($F_{19,285} = 9.61$; $p < 0.05$) compared with sham operated animals treated with LPS (Fig. 3). This result is also an evidence that the LPS-induced fever is mediated locally, and by means of stimulation of trigeminal nerve fibers.

To verify the role of local produced prostaglandins on LPS-induced fever, animals were pre-treated with the prostaglandin synthesis inhibitor diclofenac. Pre-injection of diclofenac into the periodontal tissues resulted in a significant reduction of the febrile response ($F_{36,270} = 6.81$; $p < 0.05$) compared with animals treated with vehicle and LPS. Also, i.p. injection of diclofenac, did not affect LPS-induced fever, indicating that the effect of diclofenac on fever is not to be due to a systemic action of the drug. These data are depicted in Fig. 4.

To assess whether the LPS entered the systemic circulation from the site of injection, blood samples were collected and assayed for endotoxin. In 2 rats injected with LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), small traces of endotoxin (54 and 62 pg/mL) were detected in blood plasma. In all other animals ($n = 14$), LPS plasma concentrations were below the detection limit of the assay. Besides the data showed in Fig. 3, this result corroborates the hypotheses that the induction of fever caused by injection of LPS into the periodontal tissue is indeed due to a local action of LPS, rather than a leak to systemic circulation.

In the LPS treated group, Fos-positive neurons were found bilaterally in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of hypothalamus 2 and 3 h after injections (Fig. 5). In control group (treated with saline), the number of Fos-positive neurons was significantly lower than that observed in LPS-treated group ($p < 0.05$), in the three different times of killing (Fig. 5 and 6). In the group killed one hour after treatment, very few Fos-positive neurons were found in the subnucleus caudalis and in the POA, in both groups ($p > 0.05$). Furthermore, in the oralis and interpolaris subnuclei, labeled neurons were

absent. As to the time course, it was observed that 3 h after LPS the number of Fos-positive neurons was significantly greater than at 2 h ($p < 0.05$), in the subnucleus caudalis of the spinal trigeminal nucleus and in the POA (Fig. 6). Negative control did not show any labeled neuron.

DISCUSSION

In the present study, we have locally injected LPS into the periodontal protection tissue to verify the possible induction of fever mediated by the involvement of periodontal afferent neural signals. Our results indicate that local LPS injection causes a dose-dependent febrile response. To verify the involvement of the trigeminal nerves as an afferent signal to induce the febrile response, we used a local anesthetic (mepivacaine), as well as the trigeminal nerve transection. Both treatments caused a significant reduction of the LPS-induced fever, which strongly supports a role of neural signals from the oral cavity that can be activated by inflammatory stimuli which is transmitted to the brain to induce fever. Next, we investigated such a role in more detail. To this end, we combined the LPS treatment with the local COX inhibitor, diclofenac. Our data show that the LPS-induced fever resulted from a prostaglandin dependent mechanism, since the COX inhibitor virtually abolished the LPS-induced fever. Additionally, by means of investigating the expression of *c-fos*, we showed neuronal activation in the subnucleus caudalis, where somas of the trigeminal nerve can be found, and in neurons of the POA, known to be the thermointegrative site of the central nervous system (37, 2, 23, 1, 18) in response to local injection of LPS in the periodontium.

The effect of the local anesthetic mepivacaine (attenuation of the LPS-induced fever) seems not to be due to a systemic action of mepivacaine, since i.p. injections of the anesthetic did not alter the febrile response (Fig. 2). However, it is known that local anesthetics can also block a variety of ion channels (14) not only on nerve cells, but also on inflammatory cells (36) thus affecting the immune function (33). In spite of this observation, there is strong argument indicating that the effect of anesthetics on immune function may not be directly related to the observed reduced febrile response. In a previous study, where LPS was injected locally, into the back of guinea pigs (29), it was shown that although local anesthetics blocked the febrile response, IL-6 was unimpaired by the treatment with local anesthetics (29). Further supporting this evidence is the fact that IL-6 has been reported to be the only cytokine which escapes in considerable amounts from the site of local inflammation into the systemic circulation (7). Additionally, we also applied a model of transection of the trigeminal nerve, and the results were similar to the mepivacaine treatment, *i.e.* trigeminal nerve transection also blocked the febrile response to local (periodontium) injection of LPS (Fig. 3), further supporting the role of trigeminal nerve as a afferent signaling pathway to local inflammation. To our knowledge, this is the first time that this model of transection of the maxillary trigeminal nerves was used to disrupt this route of immune-to-brain

communication. The surgical procedures were made in respect to the anatomical structures and did not affect normal baseline body temperature.

It is interesting to note that a clear febrile response was observed after LPS was injected in the periodontal tissues despite of the fact that as a general rule chronic periodontitis is not accompanied by fever. This discrepancy may be due to the fact that our model reproduces an acute periodontitis and not a chronic one. In fact, during acute periodontitis (periodontal abscesses for instance) gram negative microorganisms and consequently LPS are present, and not surprisingly fever is usually observed in these patients (17, 16, 34).

The brain plays a central role in coordinating several responses to systemic inflammation, including fever. It transduces the febrigenic signals from the periphery into appropriate adjustments of thermoeffector activity to ultimately increase body temperature. Recently, it has been proposed that blood borne mediators of the febrile response would not be the only route to activate febrile mechanisms, but rather afferent fibers traveling through the vagus nerve would also participate (2, 27). Moreover, the activation of cutaneous afferent nerves by immune signals has been also suggested to play a role in the manifestation of the febrile response (28, 29, 30). The present study adds the participation of afferent neural signals originated in the mouth and transmitted to the brain by the trigeminal nerve to this scenario. It may be true that after activation of any of these afferent pathways, ultimately an increased level of prostaglandin E₂ (the proximal mediator of fever) in the POA may take place, which is consistent with our data about *c-fos* activation in the POA (Fig. 5 and 6).

c-fos expression technique has been extensively used as a marker of neuronal activity, induced by a number of stimuli including nociceptive stimulus in the oral cavity caused by tooth movement (20) and LPS-induced pulpar inflammation (9). Interestingly, in the latter study *c-fos* expression was restricted to the caudal subnucleus of the spinal trigeminal nucleus, which is very similar to our findings (Fig. 5). Several studies have shown that the caudal part of the spinal trigeminal nucleus is an important site that relay nociceptive input from orofacial structures (35) including the dentition (4). Moreover, the nociceptive stimuli as well as fever are a process that is part of the acute-phase reaction to infection and inflammation. In the present study, *c-fos* labeling was just detected in the superficial laminae of the trigeminal subnucleus caudalis (I and II). Accordingly, *c-fos* expression in response to pulpal LPS was also detected in the superficial layers of the trigeminal subnucleus caudalis within the first few hours of LPS stimulus; Fos labeling did is detected in deeper laminae, but only at later time points. In contrast, transient noxious stimulation evokes Fos expression primarily in the superficial regions of caudal subnucleus (laminae I and II) (9).

The increase in T_b started about 1.5 h after LPS administration (Fig. 1), whereas *c-fos* expression was not observed at 1 h, but at 2 and 3 h after the endotoxin challenge (Fig. 5 and 6). These results are in agreement with Valles et al. (43) that suggest that *c-fos* response to endotoxin appears to be slower and longer lasting than that of other kinds of stressors, with maximum increases in *c-fos* expression between 2 and 4 h.

The neurochemical and neurophysiological changes induced by injury to nerves of the trigeminal system are clearly distinct from those seen following

lesions of other peripheral nerves, as recently reviewed by Fried et al. (15). For instance, the onset of spontaneous nociception in the former case is more delayed (but can be sustained for relatively long periods) and is not associated with ganglionic sympathetic terminals (3, 40). Nevertheless, current knowledge about the specific mechanisms underlying trigeminal mediated information, not only of inflammatory origin but also neuropathic, is still remarkably sparse. In this regard, the present study provides neuropharmacological insight into some of the mechanisms involved in the febrile response after LPS injection in the periodontal tissue of the rat, which is innervated by the trigeminal system. The data provided in this paper reveal significant contribution of periodontal nerves and of local COX activation associated with the LPS-induced fever.

After being infected with pathogens or challenged with pathogenic molecules such as LPS, animals display a number of behavioral alterations, namely sickness behavior that may include anorexia, adipsia, lethargy and reduced sociability (18), besides fever. In the past decades, progress has been made in the understanding the mechanisms of fever, which is considered as a hallmark of disease (18). More recently, the vagus nerve has been reported to play a key role in the mediation of sickness behavior, being an important sensorial afferent (1). The present study provides evidence that periodontal afferent nerves may be activated by immune signals to mediate the febrile response and possibly other components of the sickness behavior.

In conclusion, although differences between the trigeminal system in relation to other peripheral nerves in mediating both inflammatory and neuropathic information do exist (15), the stimulation of nerves and the participation of COX to elicit fever after local LPS injection in the rat periodontal seems not to differ from those elicited by LPS in the body.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Gustavo Michel Batista de Souza and Lidiane de Cássia Anastácio for excellent technical assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX and USP. Lidiane de Cássia Anastácia and Gustavo Michel Batista de Souza are the recipient of FAPESP technician scholarships. Valeria P. Navarro is the recipient of a FAPESP graduate scholarship.

REFERENCES

1. **Blatteis CM and Sehic E.** Fever: how may circulating pyrogens signal the brain. *NIPS* 12: 1-9, 1997.
2. **Blatteis CM, Sehic E, Li S.** Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. *Clin Infect Dis* 31: 168-177, 2000.

3. **Bongenhielm U, Boissonade FM, Westermark A, Robinson PP, Fried K.** Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. *Pain* 82(3): 283-288, 1999.
4. **Byers MR, Chudler EH, Iadarola MJ.** Chronic tooth pulp inflammation causes transient and persistent expression of Fos in dynorphin-rich regions of rat brainstem. *Brain Res* 861: 191-207, 2000.
5. **Byers MR, Dong WK.** Comparison of trigeminal receptor location and structure in the periodontal ligament of different types of teeth from the rat, cat, and monkey. *J Comp Neurol* 279(1): 117-127, 1989.
6. [Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y.](#) Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res* 733(2): 263-272, 1996.
7. **Cartmell T, Miller AJ, Mistry Y, Rothwell NJ, Luheshi GN.** Circulating IL-6 is derived from the site of inflammation in response to a localized injection of lipopolysaccharide in the rat. *J Physiol* 513: 146, 1998.
8. **Cechetto DF, Standaert DG, Saper CB.** Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 240(2):153-160, 1985.
9. **Chattipakorn SC, Sigurdsson A, Light AR, Narhi M, Maixner W.** Trigeminal *c-fos* expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. *Pain* 99: 61-69, 2002.
10. **Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson P, Ericsson-Dahlstrand A.** Inflammatory response: Pathway across the blood-brain barrier. *Nature* 410: 430-431, 2001.
11. [Elmquist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D and Saper CB.](#) Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* 381: 119-129, [1997](#).
12. [Engblom D, Saha S, Engstrom L, Westman M, Audoly LP, Jakobsson PJ, Blomqvist A.](#) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci* 6(11): 1137-1138, 2003.

13. Feil K, Herbert H. **Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei.** *J Comp Neurol* 353(4): 506-528, 1995.
14. **Fozzard HÁ, Lee PJ, Lipkind GM.** Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels. *Curr Pharm Des* 11(21): 2671-2686, 2005.
15. **Fried K, Bongenhielm U, Boissonade FM, Robinson PP.** Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. *Neuroscientist* 7(2): 155-165, 2001.
16. **Fukai K, Kato M, Mikami I, Otaki K, Hasegawa A, Seki N, Takagi M, Katagiri M.** Case report of periodontal disease with periodic neutropenia. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi* 31(4): 1242-1253, 1989.
17. **Katz J, Weinnshtein E, Barak S, Livneh A.** Dental disease in the differential diagnosis of fever of unknown origin. *Ann Dent* 51(2): 3-5, 1992.
18. **Kluger MJ.** Fever: Role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* 71 (1): 93-127, 1991.
19. **Lazarov NE.** Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 66: 19-59, 2001.
20. **Magdalena CM, Navarro VP, Park DM, Stuani MBS, Rocha MJA.** *c-fos* Expression in the rat brain nuclei following incisor tooth movement. *J Dental Res* 83: 50-54, 2004.
21. **Matthews B.** Autonomic mechanisms in oral sensation. *Proc Finn Dent Soc* 85: 365-373, 1989.
22. **Menetrey D, Basbaum AI.** Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. *J Comp Neurol* 255(3): 439-450, 1987.
23. [Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K.](#) Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci* 85(1-3): 18-25, 2000.
24. **Nakamura M, Ferreira SH.** A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 135(2): 145-152, 1987.
25. [Oka T, Oka K, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S, Saper CB.](#) Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol* 551(Pt 3): 945-954, 2003.

26. **Paxinos G, Watson, C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, 1998.
27. **Romanovsky AA.** Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. *Auton Neurosci* 85(1-3): 39-48, 2000.
28. [Ross G, Hubschle T, Pehl U, Braun HA, Voigt K, Gerstberger R, Roth J.](#) Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* 94(4): 1395-402, 2003.
29. [Ross G, Roth J, Störr B, Voigt K, Zeisberger E.](#) Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chamber in guinea pigs. *Physiol Behav* 71: 305-313, 2000.
30. **Roth J, Storr B, Martin D, Voigt K, Zeisberger E.** The role of local induction of Tumor Necrosis Factor by LPS within a subcutaneous air pouch in the febrile response in Guinea Pigs. *Neuroimmunomodulation* 7: 169-176, 2000.
31. **Saha S, Engstrom L, Mackerlova L, Jakobsson PJ, Blomqvist A.** Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin E synthase-1. *Am J Physiol Regul Integr Physiol* 288(5): R1100-1107, 2005.
32. [Schiltz JC, Sawchenko PE](#) Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci*8: 1321-1329, 2003.
33. **Schmidt W, Schmidt H, Bauer H, Gebhard MM, Martin E.** Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology* 87: 617-624, 1997.
34. **Schroder H.** Therapeutic and diagnostic problems of generalized acute suppurative periodontitis marginalis profunda. *Dtsch Zahnarztl Z* 34(6): 506-510, 1979.
35. **Sessle BJ.** Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J Endod* 12: 435-444, 1986.
36. **Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, thomsen P.** Inhibitory effects of amide local anesthetics on stimulus induced human leukocyte metabolic activation, LTB4 release and IL-1 secretion. *Acta Anesthesiol Scand* 37: 159-165, 1993.
37. [Steiner AA, Antunes-Rodrigues J, Branco LG.](#) Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Res* 944(1-2): 135-145, 2002.

38. [Steiner AA, Reste G, Branco LG](#). Role of the brain heme oxygenase-carbon monoxide pathway in stress fever in rats. *Neurosci Lett* 341(3): 193-196, 2003.
39. [Takahashi Y, Smith P, Ferguson A and Pittman QJ](#). Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol* 273: R1690-R1695, [1997](#).
40. **Tal M, Devor M**. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. *Brain R* 579(1): 148-151, 1992.
41. [Tilders FJ, Derijk RH, Vandam AM, Vincent VA, Schotanus K and Persoons JH](#). Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 19: 209-232, 1994.
42. [Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S](#). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395(6699): 281-284, 1998.
43. **Valles A, Marti O, Armario A**. Mapping the areas sensitive to long-term endotoxin tolerance in the rat brain: a *c-fos* mRNA study. *J Neurochemistry* 93: 1177-1188, 2005.
44. **Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, and Kobayashi S**. Coexpression of Microsomal-Type Prostaglandin E Synthase with Cyclooxygenase-2 in Brain Endothelial Cells of Rats during Endotoxin-Induced Fever. *The J of Neurosc* 21(8): 2669-2677, 2001.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. A: Body core temperature responses to saline and LPS (10 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) injected into the periodontal protection tissue of rats. In figures 1 – 4 the number of animals per group is shown in parentheses. (* $p < 0.05$ compared with saline-treated group). **B:** Thermal Indexes for saline, LPS 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ treatments. Values are means \pm S.E.M. (* $p < 0.05$ compared with saline-treated group).

Fig. 2. Determination of the effect of the mepivacaine on LPS fever. **A:** Body core temperature response to injection of local or i.p. mepivacaine (1.2 mg/kg) 10 min before LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) injection into the periodontal protection tissue of rats. Control animals were injected with vehicle and LPS. (* $p < 0.05$ compared with saline-treated group). **B:** Thermal indexes summarize these results. Values are means \pm S.E.M. (* $p < 0.05$ compared with LPS and vehicle-treated group).

Fig. 3. A: Effect of maxillary trigeminal nerves transection on the LPS-induced febrile response. LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was injected into the periodontal protection tissue of both groups of rats (nerve- transected and sham-operated; * $p < 0.05$ compared with sham-operated group). **B:** Thermal Indexes after LPS treatment in sham-operated or nerve-transected rats (* $p < 0.05$ compared with sham-operated group).

Fig. 4. Determination of the effect of the diclofenac on LPS fever. Body core temperature response to injection of i.p. or local diclofenac (5 mg/kg) and LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) into the periodontal protection tissue of rats. Control animals were injected with vehicle and LPS (* $p < 0.05$ compared with saline-treated group).

Fig. 5. Photomicrography of preoptic area of hypothalamus (**A**) and subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus (**B**) showing Fos-IR neurons after single saline or LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) injection on periodontium in different times of killing: 2 and 3 h after injection. Negative control group did not show any labeled neuron. AVPO: preoptic area, OX: optic chiasm, 3V: 3rd ventricle, Sp5C: caudal part of spinal nucleus. A1: saline, A2: negative control, A3: LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 2 h, A4: LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 3 h. B1: saline, B2: negative control, B3: LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 2 h, B4: LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 3 h.

Fig. 6. Effect of periodontium LPS injection (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) on *c-fos* expression, in three different times of killing: 1, 2 and 3 h after injection. Control animals were treated with sterile saline. Bars represent the average \pm SEM (n=4 animals per group) of the number of *c-fos* IR neurons. **A:** subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus, **B:** preoptic area of hypothalamus (* $p < 0.05$ compared with saline-treated group); nd, not detectable. Negative control group did not show any labeled neuron.

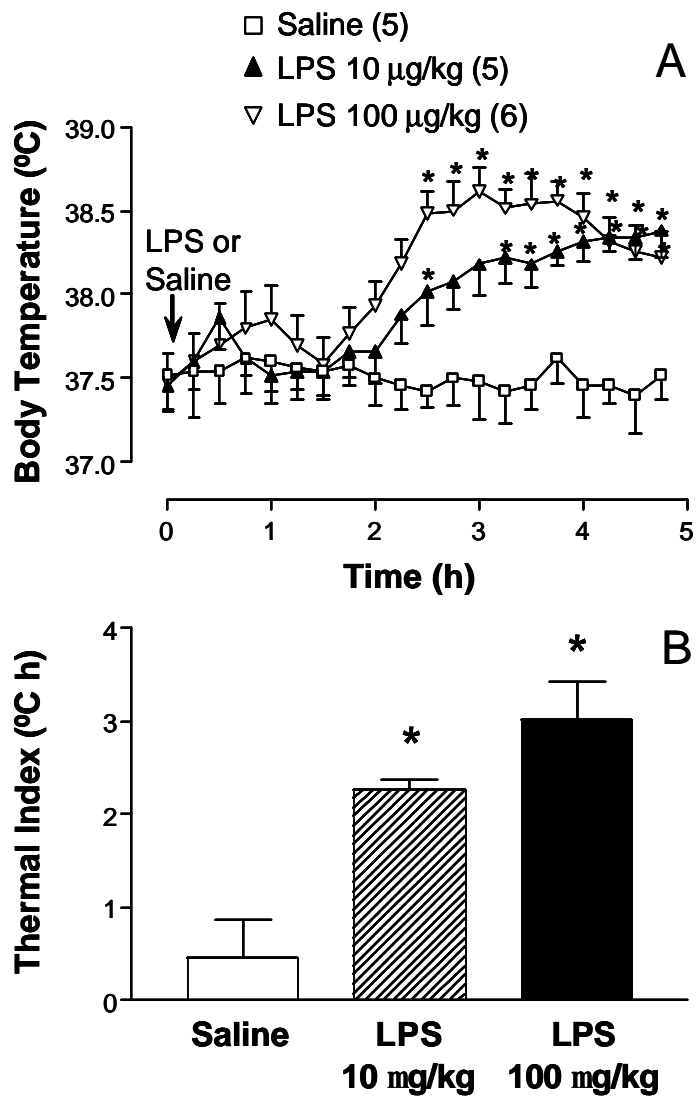


Fig. 1

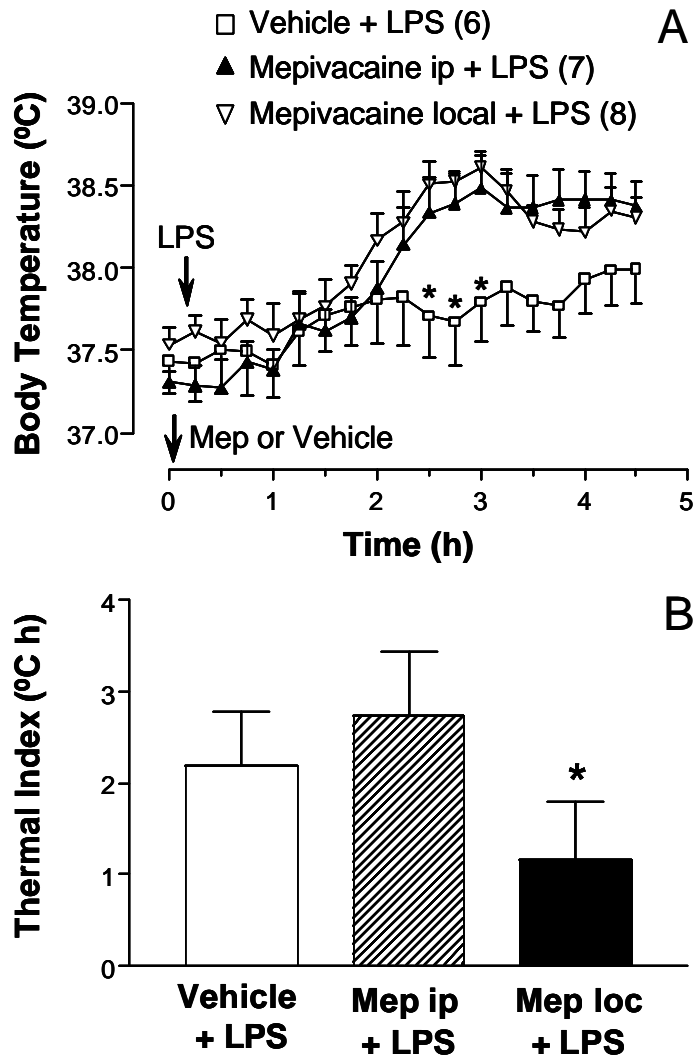


Fig. 2

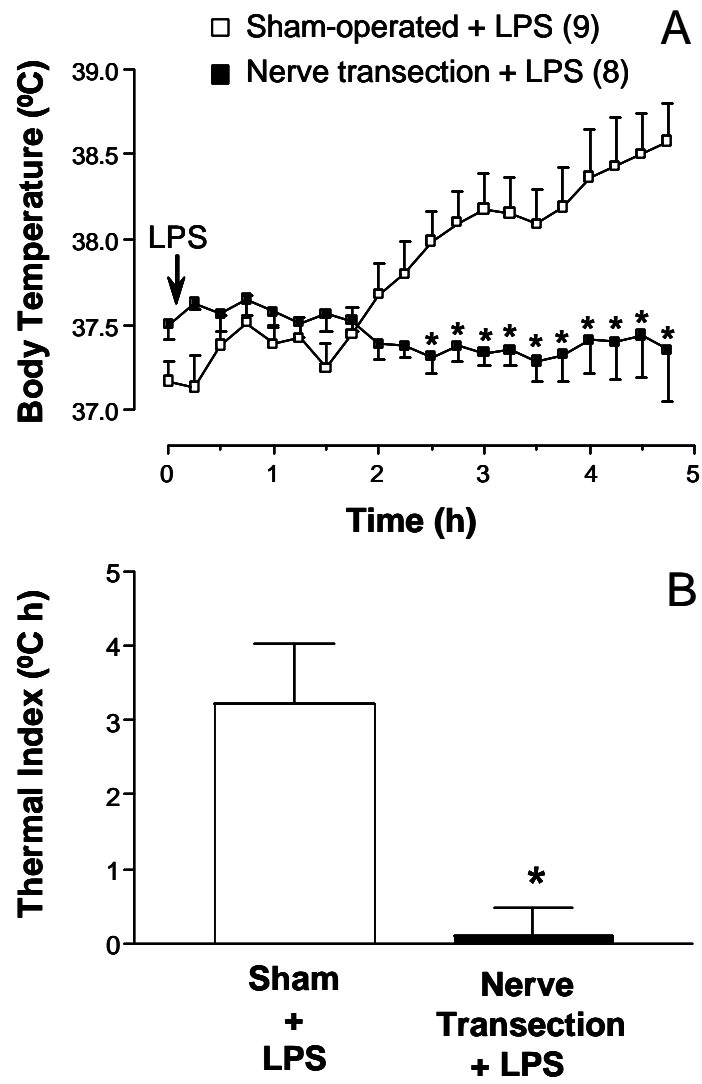


Fig. 3

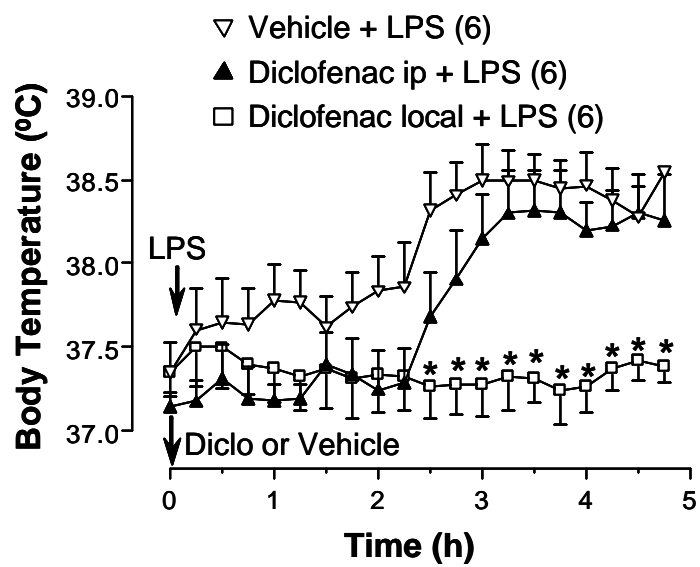
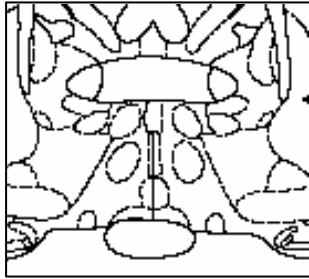
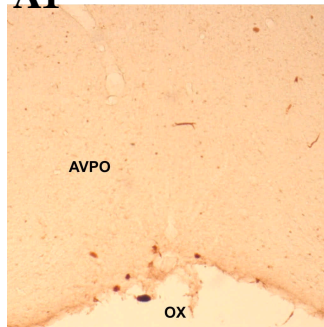


Fig. 4

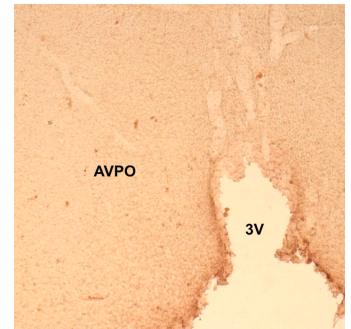
A



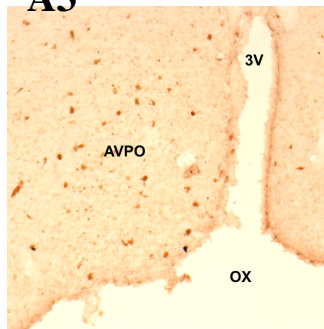
A1



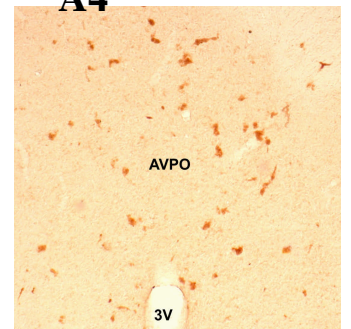
A2



A3

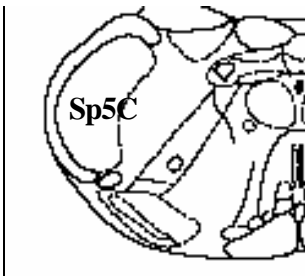


A4

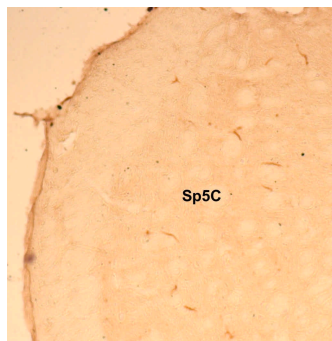


100 μ m

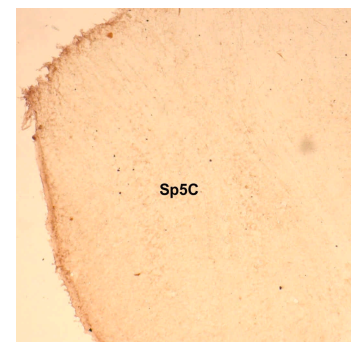
B



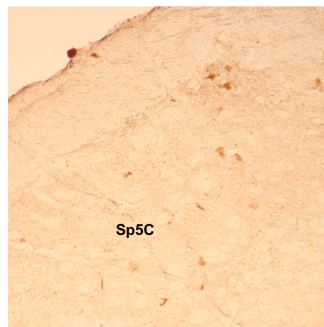
B1



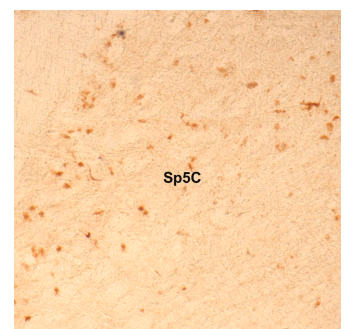
B2



B3



B4



100 μ m

Fig. 5

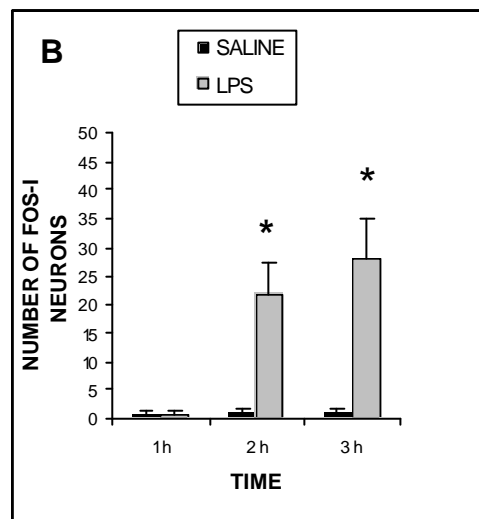
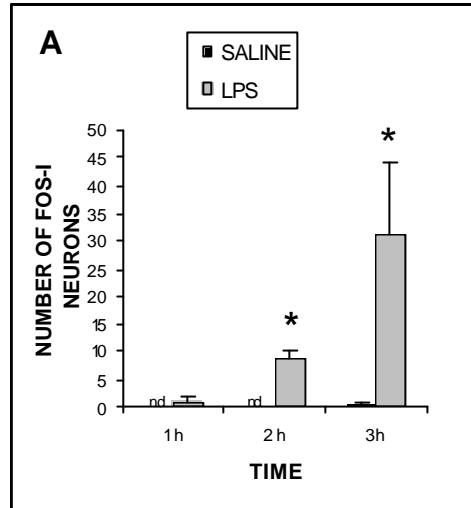


Fig. 6

ANEXO 2 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Valéria Pontelli Navarro Tedeschi

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social

Ribeirão Preto/ Janeiro 2006
Avenida do Café, s/n CEP 14040-904
e-mail: valeriapontelli@hotmail.com

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)