UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL, ODONTOLOGIA PREVENTIVA
E SOCIAL

**TOLERÂNCIA A ENDOTOXINA NO
PERIODONTO DE RATOS: PARTICIPAÇÃO DO
ÓXIDO NÍTRICO**

Valéria Pontelli Navarro Tedeschi

Ribeirão Preto
2009

VALÉRIA PONTELLI NAVARRO TEDESCHI

**TOLERÂNCIA A ENDOTOXINA NO PERIODONTO DE
RATOS: PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO**

▪

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Ribeirão Preto

2009

Tedeschi, Valéria Pontelli Navarro

Tolerância a endotoxina no periodonto de ratos: participação do óxido nítrico. Ribeirão Preto, 2009.

101p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa: Odontopediatria.

Orientador: Branco, Luiz Guilherme de Siqueira

1. Tolerância, 2. Febre, 3. Periodontal, 4. Óxido nítrico,
5. Endotoxina.

VALÉRIA PONTELLI NAVARRO TEDESCHI

**TOLERÂNCIA A ENDOTOXINA NO PERIODONTO DE
RATOS: PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO**

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

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

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
2007-2009	Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

OFEREÇO ESTE TRABALHO

À **Deus**,

*Por abençoar e guiar 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 pela compreensão,

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.

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 no mestrado e no doutorado,*

*Obrigada Professor,
pelos ensinamentos em pesquisa,
pela compreensão e por sempre me ouvir com paciência,
por responder minhas dúvidas,
Obrigada pela orientação séria e competente,
por me deixar aprender seguindo seus exemplos.
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**.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela recepção e cordialidade por mim dispensada e por ter me permitido aprender muito com o curso de mestrado e doutorado. Meu apreço e reconhecimento.

A todos os **Docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**, agradeço a amizade e os ensinamentos recebidos.

Aos **Professores da FORP**, 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.

Àos meus **avós Elidia, Eliseu, Isabel** (in memoriam) e **Bartolomeu** (in memoriam) por estarem sempre torcendo por mim.

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

A todos meus **familiares** meus agradecimentos.

A todos os **amigos** que cultivei nessa faculdade, obrigada pela amizade e pelo apoio. Aprendi muito com vocês. É muito bom poder compartilhar com vocês minhas ansiedades e alegrias.

Aos meus **amigos de turma do doutorado** e a todos os **pós-graduandos da Odontopediatria**, agradeço a cumplicidade e amizade. Foi muito bom crescer junto com vocês.

Aos meus **amigos do laboratório de Fisiologia**, 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 na companhia de vocês me acrescentou muito pessoalmente e profissionalmente. Muito obrigada.

Aos **funcionários da Forp**, obrigada pelo atendimento eficiente e cordial e pela amizade.

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.

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende".
(Leonardo da Vinci)*

Tedeschi, V.P.N. Tolerância a endotoxina no periodonto de ratos: participação do óxido nítrico. [Tese]. Ribeirão Preto: FORP – Universidade de São Paulo; 2009.

A injeção de doses repetidas de lipopolissacarídeo (LPS) resulta em atenuação da resposta febril, que é chamada de tolerância a endotoxina. Esta resposta já foi caracterizada em ratos por meio de injeções sistêmicas. No presente estudo, nós testamos a hipótese que a tolerância a endotoxina ocorre localmente nos tecidos periodontais de proteção de ratos e que o óxido nítrico participa desta tolerância. Ratos machos Wistar foram injetados nos tecidos periodontais de proteção com solução salina ou LPS de *Escherichia coli* na dose de 100 µg/kg em 3 dias consecutivos com 24 horas de intervalo. A temperatura corporal (Tc) foi medida por meio de datalogger 1 h antes e 6 h após as injeções. Outro grupo experimental recebeu injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de L-NMMA (500 µg/rato) 30 min antes da injeção de LPS no terceiro dia. Além disto, foi realizada a imunohistoquímica para proteína Fos para verificar a ativação neuronal na Área Pré-óptica do hipotálamo (POA) e no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal no primeiro dia (animais não tolerantes) e terceiro dia (animais tolerantes) do tratamento com LPS, e também em animais que receberam L-NMMA ou salina i.c.v. no terceiro dia, antes do LPS. No dia, 1 após a injeção de LPS, foi observado uma resposta febril polifásica, no dia 2 houve uma alteração no padrão desta resposta e no dia 3 a resposta febril foi completamente abolida, caracterizando o desenvolvimento de tolerância a endotoxina na cavidade oral. Esta tolerância foi revertida com o pré-tratamento com L-NMMA no terceiro dia e os animais voltaram a apresentar febre. A imunohistoquímica detectou um aumento na expressão da proteína Fos no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na POA no dia 1 em animais que receberam LPS, aumento este que foi abolido no dia 3 de tratamento com LPS. Da mesma forma que observamos a reversão do mecanismo de tolerância com o desenvolvimento da resposta febril no terceiro dia, o pré-tratamento com L-NMMA aumentou o número de células Fos positivas em ambas às áreas estudadas. Estes resultados indicam que ratos desenvolvem tolerância ao LPS

nos tecidos periodontais e que o óxido nítrico participa desse mecanismo de tolerância induzido por LPS no periodonto de ratos.

Palavras chave: Tolerância; febre; periodontal; óxido nítrico; endotoxina.

Tedeschi, V.P.N. Endotoxin tolerance in the periodontal of rats: participation of the nitric oxide. [Thesi]. Ribeirão Preto: FORP – University of São Paulo; 2009.

Systemic injection of repeated doses of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) results in attenuation of the febrile response, i.e. endotoxin tolerance, which has been well characterized systemically in rats. In the present study, we tested the hypothesis that endotoxin tolerance also occurs after repeated local injection of LPS into periodontal protection tissue of rats and that nitric oxide plays a role in this mechanism. Male Wistar rats were given a gingival injection of sterile saline or LPS at a dose of 100 µg/kg on three consecutive days with 24 hours break. Body core temperature (T_b) was measured with a miniature datalogger 1 hour before and 6 hours after the injections. Another group received L-NMMA (500µg/rat) intracerebroventricular (i.c.v.), 30 minutes before LPS, in the third day. Besides it, was performed the Fos immunohistochemistry to verify the neuronal activation in the preoptic area of hypothalamus (POA) and in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus in the first day (non-tolerant animals), in the third day of LPS treatment (tolerant animals) and in the animals that received L-NMMA or saline i.c.v. in the third day, before LPS. On day one we observed a polyphasic febrile response after LPS injection. On day two this response was sensitized and on day three the febrile response was completely abolished, characterizing the development of the endotoxin tolerance in the oral cavity. This tolerance was reverted with the pretreatment with L-NMMA in the third day and the animals develop the febrile response. The immunohistochemistry detected an increase in Fos protein expression in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the POA on day one in animals that received LPS and a reduction in Fos expression was observed on day three. Similarly to the reversion of the tolerance mechanism by the development of the febrile response in the third day, the pretreatment with L-NMMA, increased the number of Fos positive cells in both studied areas. These results indicate that rats develop endotoxin tolerance in periodontal tissues and that nitric oxide plays a role in this mechanism.

Key words: Tolerance; fever; periodontal; nitric oxide; endotoxin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2. PROPOSIÇÃO.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4. RESULTADOS.....	40
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	65
8. ANEXOS.....	78

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A odontologia atual deixou de ser uma especialidade meramente tecnicista e hoje vive o que pode ser denominado de “era biológica”. Cada vez mais se pesquisam e buscam-se materiais e técnicas que não promovam nenhum tipo de injúria ao organismo. A facilidade do acesso a informação, faz com que os pacientes procurem cada vez mais entender suas patologias e desta forma, entender os mecanismos fisiopatológicos das afecções bucais se torna, progressivamente, essencial para nossa profissão.

A infecção dos tecidos bucais e sua relação com a saúde geral têm sido estudadas 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 e Saunders, 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, 1979), além, obviamente, de procedimentos mais invasivos como o tratamento endodôntico, 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 e Mulligan, 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 têm sido relatadas 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).

Quando o organismo é invadido por microorganismos infecciosos, diversas reações sistêmicas desenvolvem-se imediatamente, com o intuito de combater os efeitos deletérios dos patógenos invasores e finalmente, restaurar a saúde. Esse processo é conhecido como inflamação e as respostas são temporalmente divididas em 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).

Por definição, febre é o aumento regulado da temperatura corporal (T_c) (Kluger, 1991). Nesta condição, 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).

É importante destacar que, diferente do que acontece na febre, a hipertermia resulta da falha dos mecanismos termorreguladores em evitar que a temperatura corporal se eleve acima do valor de eutermia, devido à alta sobrecarga de calor ambiental ou metabólica. Dessa forma, torna-se evidente que febre e hipertermia consistem em processos distintos.

A febre certamente é o sintoma mais antigo utilizado como indicativo de estado infeccioso. Um número crescente de estudos mostra que a febre é extremamente conservada ao longo da escala filogenética, sendo retida ao longo da evolução de vertebrados e invertebrados. A preservação dessa resposta ao longo da evolução é um forte indício de que ela deve possuir papel protetor e adaptativo (Kluger, 1991). 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. E também, a febre representa condições desfavoráveis para o crescimento da maioria dos microorganismos patogênicos (Garibaldi, 1972; Grieger & Kluger, 1978).

Além disso, 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 bacteriana (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 a morte (Kluger *et al.*, 1975).

Para que a resposta febril ocorra, é necessária a comunicação entre o sistema imune e o SNC, onde ocorre a regulação da Tc. Tal comunicação é mediada por uma variedade de fatores endógenos (pirogênios endógenos), os quais são membros de uma classe de polipeptídeos imunorregulatórios chamados de citocinas, dentre as quais se destacam: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Kluger, 1991; Blatteis & Sehic, 1998), bem como derivados do metabolismo dos lipídeos como as prostaglandinas (PGs) (Milton, 1989).

As citocinas são produzidas por vários tipos celulares, principalmente fagócitos mononucleares, quando ativados por sinais provenientes dos organismos invasores, ou seja, os pirógenos exógenos e seus produtos (Kluger, 1991). Acredita-se que essas citocinas, uma vez liberadas na circulação sistêmica, sinalizem a POA que sabidamente é o sítio primário do controle termorregulador (Boulant, 2000). No entanto, é controverso como as citocinas alcançam a POA devido o fato de serem grandes peptídeos hidrofílicos e, portanto, não atravessam a barreira hemato-encefálica por difusão simples. Vários mecanismos são sugeridos, a saber: (1) Transporte ativo das citocinas pela barreira hemato-encefálica (Banks *et al.*, 1995); (2) Entrada das citocinas no SNC via órgãos circumventriculares, os quais contêm barreira hemato-encefálica enfraquecida, particularmente, o *organum vasculosum laminal terminalis* (OVLT) e órgão subfornicial (SFO) (Takahashi *et al.*, 1997); (3) Interação das citocinas com células localizadas na interface hemato-encefálica, como por exemplo, células endoteliais (Tilders *et al.*, 1994) e perivasculares (Elmqvist *et al.*, 1997); (4) Estimulação de fibras aferentes que trafegam, principalmente, através do nervo vago e fazem sua primeira sinapse

no núcleo do trato solitário (NTS) (Blatteis *et al.*, 2000; Romanovsky *et al.*, 2000).

Na POA, a prostaglandina E₂ (PGE₂) parece ter papel de mediador final na produção da resposta febril (Milton, 1989), induzindo mudanças funcionais hipotalâmicas que levam à ativação dos mecanismos periféricos de produção e conservação de calor, elevando a T_c e, portanto, produzindo a febre.

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

A história da endotoxina tem início em meados de 1870, quando pesquisadores demonstraram que bactérias produzem doenças por meio da produção de toxinas. As primeiras toxinas identificadas foram as exotoxinas, substâncias secretadas ativamente por muitas bactérias como aquelas responsáveis pela difteria, tétano e botulismo. Hoje se sabe 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 (Rietschel & Brade, 1992).

A estrutura das endotoxinas começou a ser conhecida a partir das décadas de 30 e 40, quando foi observado que elas são constituídas de polissacarídeos, lipídeos e proteína, sendo o material tóxico representado pela porção lipídica e polissacarídica. Por isso as endotoxinas passaram a receber a denominação de lipopolissacarídeos (*c.f.* Rietschel & Brade, 1992).

As bactérias gram-negativas apresentam dupla membrana: externa e interna (Glauert & Thornley, 1969). Entre elas está o espaço periplasmático, o qual contém os peptideoglicanos e proteínas periplasmáticas. Os peptideoglicanos são responsáveis pela forma das células, proteção do citoplasma frente às diferenças de pressão osmótica entre os meios externo e

interno e confere rigidez ao corpo bacteriano. A membrana externa é uma dupla membrana que contém fosfolípidos e proteínas (Nikaido & Vaara, 1985). A camada interna da membrana externa contém lipoproteínas que estão ligadas ao peptidoglicanos; a camada externa contém os lipopolissacarídeos (Fig. 1). 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).

O LPS consiste em uma porção lipídica, denominada Lipídeo A, e uma porção polissacarídica, a qual se subdivide em duas regiões: o oligossacarídeo central e o antígeno "O" (Fig. 1). O oligossacarídeo central consiste em uma cadeia pequena de açúcares, ligado em sua porção interna ao Lipídeo A, e em sua porção externa ao antígeno "O". Este por sua vez, corresponde a uma cadeia longa de açúcares e é a porção do LPS que é reconhecida pelos anticorpos. O Lipídeo A é a porção que origina a toxicidade e os efeitos pirogênicos do LPS. 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).

Figura 1: Modelo da membrana celular externa e interna de *Escherichia coli*. O LPS está ancorado na membrana externa e divide-se estruturalmente em lipídeo A, oligossacarídeo central e antígeno "O" (adaptado de Raetz & Whitfield, 2002).

Para que as endotoxinas sejam efetivas, precisam ser liberadas da superfície da bactéria gram-negativa, o que acontece quando as bactérias morrem ou se multiplicam. Uma vez livres, não produzem seus efeitos diretamente, mas se ligam a células particulares induzindo-as a secretarem moléculas mediadoras. Os macrófagos são os alvos principais. Inicialmente, o LPS liga-se à proteína ligante do 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 citocinas (Barnes & Karin, 1997; Karin & Ben-Neriah, 2000).

Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização intracelular ativada pelo LPS (adaptado de Roberts et al, 2002).

Desta forma, 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 E_2 (PGE_2), tromboxana A_2 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).

Estando na circulação sangüínea, estes mediadores endógenos podem sinalizar o cérebro e estimular a produção de prostaglandinas no hipotálamo, elevando o “set point” termorregulatório e, assim, desencadeando a resposta febril (Kluger, 1991), ou então estimular receptores hepáticos (Blatteis & Sehic, 1997) que enviam aferências para o sistema nervoso central (SNC) promovendo a resposta característica de febre. Esta última hipótese se baseia no fato de que a vagotomia subdiafragmática abole a resposta febril induzida por injeção de LPS em baixas doses (Romanovsky *et al.*, 2005).

A redução da resposta febril ao LPS, quando este é administrado repetidamente em intervalos curtos de tempo, é chamada de tolerância ao LPS (Beeson, 1947). Embora os mecanismos responsáveis por este fato não estejam totalmente esclarecidos, tem sido proposto que mecanismos centrais que participam da antipirese endógena podem contribuir para a tolerância ao LPS. Sabe-se que o neuropeptídeo arginina-vasopressina (AVP), liberado centralmente durante febre em ovelhas (Cooper *et al.* 1979) e coelhos (Malkinson *et al.*, 1987) resulta em antipirese e que a administração bilateral de antagonistas do receptor vasopressinérgico V1 na área septal ventral aumenta a resposta febril ao LPS em animais tolerantes (Wilkinson & Kasting, 1990). Além disso, já foi demonstrado que a diminuição da resposta febril em animais tolerantes ao LPS está associada a uma redução da produção sistêmica de algumas citocinas como TNF e IL-6 (Roth *et al.*, 1994), mas não da produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) no hipotálamo (Chemo *et al.*, 1997).

A administração repetida de LPS em curtos intervalos de tempo produz atenuação da resposta febril. Tal fenômeno é chamado de tolerância à endotoxina que tem sido descrita em estudos há mais de 50 anos atrás (Beeson, 1947). A habilidade dos animais tornarem-se tolerantes ao LPS é crucial para a sobrevivência do organismo e para a produção de respostas inflamatórias controladas (*c.f.* Nava & Carta, 2000). Animais tolerantes não apenas exibem respostas menos pronunciadas a doses não-letais de LPS, mas

eles também conseguem sobreviver a doses de LPS tipicamente letais, que causam a morte em animais não-tolerantes (Ivanov *et al.*, 2000).

De fato, assume-se que a tolerância ao LPS seja uma resposta adaptativa. Além de conferir proteção contra a letalidade do LPS, o estado de tolerância tem sido associado com a melhora de muitas respostas imunes. Estudos *in vitro* mostraram que fagócitos pré-tratados com LPS aumentam a produção de ânion superóxido e a fagocitose (Leon *et al.*, 1992). Ainda, Lehner *et al.* (2001) mostraram que apesar da atenuação das respostas das citocinas, a tolerância ao LPS foi associada com o aumento da resistência à infecção por bactérias gram-negativas, mediada principalmente, pela melhora da função imune inata.

Portanto, a investigação sobre os mecanismos envolvidos na tolerância ao LPS tem sido de considerável interesse.

A tolerância à endotoxina é dividida temporalmente em duas fases. A fase precoce ou fase não-imunológica ocorre logo após a exposição ao LPS e é transiente, com duração de poucos dias (Zeisberger & Roth, 1998). Essa fase parece ocorrer em resposta a mediadores endógenos como as citocinas (Erroi *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1988) e fatores de crescimento (Randow *et al.*, 1995). A fase tardia ou fase imunológica ocorre em semanas após a exposição inicial ao LPS, persiste por várias semanas e parece estar relacionada com a formação de anticorpos anti-LPS (Lindberg *et al.*, 1983).

Muthukuru, *et al.*, 2005, pela primeira vez sugeriram a existência de tolerância ao LPS presente na mucosa bucal, através de PCR os autores comprovaram que após administrações consecutivas de LPS os receptores TLR 2 e TLR 4 (receptores localizados em macrófagos e responsáveis pelo reconhecimento da molécula de LPS e ativação do sistema imune) foram “down regulated”. Concluíram também que após uma segunda dose de LPS houve uma redução do nível de TNF- α e IL-6. Porém, a caracterização da tolerância por uma manifestação sistêmica (por meio da febre, por exemplo, que é um marco da resposta de fase aguda) nunca foi realizada.

Numerosos estudos têm demonstrado a importância do gás volátil NO em diversos processos biológicos como neurotransmissão, regulação da pressão arterial, regulação de processos mediados pelo sistema imune, termorregulação e febre. O *fator de relaxamento derivado do endotélio*, descrito

por Furchgott e Zawadzki, em 1980, e posteriormente identificado como NO, foi primeiramente apontado como agente responsável pela manutenção de um tônus vasodilatador (Moncada *et al.*, 1991; Cárnio & Branco, 1997). Endogenamente, a formação do NO se dá através da conversão do aminoácido L-arginina resultando na formação de L-citrulina e NO. Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que se apresenta sob três isoformas, sendo duas constitutivas e uma induzível (Bredt *et al.*, 1991). As isoformas constitutivas são a NOS endotelial (eNOS), expressa nas células endoteliais vasculares, e a NOS neuronal (nNOS), existente em células nervosas. A isoforma induzível (iNOS) é expressa em macrófagos e em outras células, incluindo células do sistema nervoso central, em resposta a citocinas e pirógenos exógenos (Griffith & Stuehr, 1995). Estudos recentes têm mostrado que análogos da arginina podem inibir a síntese do NO (Moncada *et al.*, 1991).

As isoformas da enzima NOS estão vastamente distribuídas pelo corpo (Dawson & Snyder, 1994; Moncada *et al.*, 1991). Uma vez que a NOS é encontrada em vários tecidos envolvidos na regulação da Tc (Steiner & Branco, 2001) e do sistema imune, parece provável que este neurotransmissor influencie na termorregulação e febre. Neste contexto, já foi demonstrado que a administração sistêmica de inibidores da NOS bloqueia a febre produzida por endotoxina em ratos e cobaias (Kamerman & Fuller, 2000; Roth *et al.*, 1998; Scammell *et al.*, 1996), por MDP em cobais (Kamerman & Fuller, 2000), e por levedura (Ataoglu *et al.*, 2000) e interleucina 1 (IL-1) em ratos (Reimers *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1998). Além disso, já foi demonstrado que a administração sistêmica de L-NAME bloqueia a febre induzida por estresse de contenção e de campo aberto (De Paula *et al.*, 2000; Sozynski, 2001). Estudos também têm sido feitos a fim de se avaliar os efeitos centrais do NO. Demonstrou-se que a injeção intracerebroventricular de doadores do NO resulta em antipirese em coelhos (Gourine, 1995). Estudos recentes mostraram também que a administração i.c.v. de L-NAME aumenta a febre induzida por estresse de contenção em ratos (De Paula, 2000). Além disso, animais tolerantes ao LPS desenvolvem maior resposta febril quando pré-tratados com inibidores inespecíficos da síntese do NO (Almeida *et al.*, 1999; Gourine, 1995), sugerindo que a via do NO possui um papel no mecanismo de tolerância a endotoxinas. Em conjunto, esses dados mostram que as ações

termorregulatórias exercidas pelo NO são sítio-específicas (periferia ou SNC). Assim, parece que o NO, perifericamente, age como uma molécula pró-pirética e, no sistema nervoso central, como uma molécula antipirética.

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 existiam relatos na literatura sobre a possível modulação da expressão de *c-fos* nos núcleos do sistema trigeminal e na área pré-óptica do hipotálamo após injeções consecutivas de LPS no periodonto.

Deste modo, evidencia-se que há uma rica produção de conhecimento em relação às respostas fisiopatológicas frente à infecção sistêmica, principalmente utilizando-se do modelo da injeção 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 à tolerância às infecções bucais praticamente nada era conhecido.

Em vista disto, desenvolvemos protocolos experimentais para estudar a tolerância ao LPS presente no periodonto de ratos. A metodologia utilizada foi semelhante à utilizada no projeto de mestrado, pois se mostrou eficaz e possibilitou uma abordagem inédita da infecção local no periodonto por LPS, mostrando a participação do nervo trigêmeo e do mediador prostaglandina nestas infecções. Neste projeto de doutorado, os conhecimentos foram expandidos com uma abordagem, também inédita, da existência da tolerância

ao LPS nas infecções bucais. Além disto, foi verificada a participação do NO na tolerância.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Nosso objetivo foi testar a hipótese de que ratos desenvolvem tolerância ao LPS presente no periodonto. A metodologia utilizada foi semelhante à utilizada no projeto de mestrado, pois se mostrou eficaz e possibilitou uma abordagem inédita da infecção local no periodonto por LPS, mostrando a participação do nervo trigêmio e do mediador prostaglandina nestas infecções. Neste projeto de doutorado, expandimos os conhecimentos fazendo uma abordagem, também inédita, da existência da tolerância ao LPS nas infecções bucais. Além disto, foi também verificado a participação do NO na tolerância induzida por LPS.

OBJETIVOS:

Baseado nas informações acima, este projeto teve como objetivos:

1. Analisar a resposta de ratos a injeções repetidas de LPS no periodonto, verificando o possível desenvolvimento de tolerância;
2. verificar o possível envolvimento do NO na tolerância local ao LPS e
3. verificar se há alteração da ativação neuronal na área pré-óptica do hipotálamo e no subnúcleo caudal núcleo trigeminal pela ocorrência de tolerância, após administrações consecutivas de LPS no periodonto, e após a inibição do NO centralmente.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 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° 06.1.142.53.8).

3.2 CIRURGIA PARA IMPLANTAÇÃO DO DATALOGGER

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) 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. Uma sonda para medida da temperatura corporal (datalogger) (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada) 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.

3.3 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, streptomycina-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.

3.4 CIRURGIA DE ESTEREOTAXIA .

Em outro grupo experimental os animais após anestesia foram fixados em um estereotáxico. Uma cânula de aço inoxidável (0.7 mm o.d.) foi introduzida no ventrículo lateral cerebral [coordenadas: anterior – 1.0 mm, lateral – 1.6 mm, vertical 3.2-3.7 mm e – 3.3 mm dos incisivos (Paxinos & Watson, 1998)]. O deslocamento do menisco em uma coluna de água acoplada à cânula por um cateter PE-50 indicou a correta posição da cânula no terceiro ventrículo. A cânula foi fixada à cabeça do animal através de parafusos e com a confecção de um arca-bouço de resina acrílica, sendo fechada com um mandril de aço inoxidável. Após a cirurgia os animais receberam uma injeção de antibiótico e os experimentos foram iniciados depois de uma semana.

3.5 MEDIDA DA TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura corporal dos animais foi obtida utilizando-se os dataloggers (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada). 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 utilizando-se o programa The SubCue Program Software (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada). Os dados foram corrigidos com uma formula de correção aplicando os dados de calibração nos dados de temperatura obtidos. Os dados de calibração são específicos para cada datalogger individualmente.

3.6 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, na dose de 100 µg/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.

O L-NMMA foi obtido da Sigma Chemical Co (EUA), dissolvido em solução salina e injetado i.c.v. na dose de 500 µg/1µL por rato.

Doses foram determinadas em experimentos piloto em nosso laboratório e baseados em estudos prévios (Navarro *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2000).

3.7 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

3.7.1. Perfusão transcardíaca e cortes cerebrais: em 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 transcardiacamente 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 crioprotégidas 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).

3.7.2. Imunohistoquímica para Fos: As terceiras secções 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 biotinilado 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 avidina-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).

3.7.3. Análise da imunohistoquímica: Os cortes foram analisados por microscopia de luz e para quantificação, os neurônios marcados foram detectados com uma objetiva de x10 de um microscópio equipado com uma câmera lúcida (Nikon Eclipse E600). Para uma célula ser considerada positiva, o seu núcleo neuronal deve ter tamanho apropriado (diâmetro do núcleo variando de 8 a 15 μm) e forma (oval ou redondo) e ser distinguida do “background” no aumento de $\times 10$. Para quantificação, todos os cortes cerebrais de cada núcleo (subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e da área pré-óptica do hipotálamo) foram contados unilateralmente para cada rato. Os cortes foram selecionados baseados no Atlas Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1998) e foram contados sem conhecimento prévio do tratamento experimental.

3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.8.1. PROTOCOLO 1

Desenvolvimento de tolerância ao LPS administrado localmente no periodonto de proteção de ratos:

A tolerância ao LPS foi induzida nos animais por meio da administração local de 3 injeções de LPS internamente na cânula de polietileno implantada no periodonto a uma dose de 100 $\mu\text{g/kg}$, em 3 dias consecutivos. As doses propostas na literatura para ratos são de 100 $\mu\text{g/kg}$ 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-peritonalmente (Perotti et al, 1999). O volume final injetado foi de 10 μL (3 μL de ar, seguido de 3.5 μL de solução de LPS e finalmente 3.5 μL de ar), utilizando uma seringa Hamilton de 5 μL . A T_c dos animais foi medida durante 1 hora antes da primeira injeção de 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 6 horas. A segunda injeção de LPS foi

feita 24 horas após a primeira, e a terceira, 48 horas após a primeira injeção. Animais controle receberam injeções intra-cânula do mesmo volume de solução salina a 0,9%.

3.8.2. PROTOCOLO 2

Efeito do L-NMMA sobre a Tc em animais tolerantes ao LPS:

Após administração local de 2 injeções de LPS internamente na cânula de polietileno implantada no periodonto a uma dose de 100µg/kg, em 2 dias consecutivos, no terceiro dia a Tc foi medida por 30 minutos em intervalos de 5 em 5 minutos para a determinação da temperatura basal e então os animais receberam injeção i.c.v. de 0,1µl de *L-NMMA* (500µg/1µL) e após 30 minutos receberam a terceira injeção de LPS na cânula. Após a injeção de LPS a Tc foi monitorada por 6 horas, sendo medida de 5 em 5 minutos. Animais controle receberam injeção i.c.v. de 0,1µl de salina.

3.8.3. PROTOCOLO 3

Verificação e quantificação da expressão de proteína Fos imunorreativa no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na área pré-óptica do hipotálamo após administração de LPS no periodonto de ratos, no primeiro, segundo e terceiro dia de injeções:

Para verificar a possível modulação da expressão de *c-fos* por meio de tolerância, esta proteína foi pesquisada no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na área pré-óptica do hipotálamo, após injeções repetidas de 100 µg/kg de LPS, administrado (via cânula) no periodonto de ratos. A segunda injeção de LPS foi feita 24 horas após a primeira, e a terceira, 48 horas após a primeira injeção. Estes animais foram anestesiados e perfundidos

3 horas após cada injeção de LPS. Os cortes cerebrais foram processados para imunohistoquímica e os neurônios imunoreativos foram quantificados.

3.8.4. PROTOCOLO 4:

Verificação e quantificação da expressão de proteína Fos imunorreativa no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na área pré-óptica do hipotálamo após administração de LPS no periodonto de ratos, no primeiro, segundo e terceiro dias de injeções e injeção i.c.v. de L-NMMA no terceiro dia.

Para verificar a possível modulação da expressão de *c-fos* por meio de tolerância e a possível reversão dessa modulação por L-NMMA, esta proteína foi pesquisada no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e na área pré-óptica do hipotálamo, após injeções repetidas de 100 µg/kg de LPS, administrado (via cânula) no periodonto de ratos. A segunda injeção de LPS foi feita 24 horas após a primeira, e a terceira, 48 horas após a primeira injeção, 30 minutos antes da terceira injeção de LPS foi realizada injeção i.c.v. de 0,1 µl de L-NMMA (500 µg/1 µL). Estes animais foram anestesiados e perfundidos 3 horas após cada injeção de LPS. Os cortes cerebrais foram processados para imunohistoquímica e os neurônios imunoreativos foram quantificados.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores foram expressos como média ± 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 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.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1 METODOLOGIA UTILIZADA

O modelo utilizado para simular uma infecção aguda periodontal por LPS em ratos foi o mesmo utilizado previamente no projeto de mestrado e se adaptou muito bem às necessidades desse 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). 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 EM TRÊS DIAS CONSECUTIVOS NA TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS

A Figura 1 mostra o efeito da injeção de LPS em três dias consecutivos, nos tecidos periodontais, na temperatura corporal de ratos. A dose de LPS utilizada foi de 100 µg/kg por dia. O objetivo deste protocolo experimental foi avaliar o desenvolvimento de tolerância ao LPS administrado localmente no periodonto de proteção de ratos. A injeção de LPS no periodonto no primeiro dia levou a um aumento estatisticamente significativo da temperatura corporal dos animais, caracterizando uma resposta febril, quando comparados com os controles, que receberam injeção de solução salina estéril e apirogênica no periodonto [$F(1,24)=5.20$, $P=0.04$].

Podemos observar pela análise do gráfico da Figura 1 que as temperaturas corporais dos animais injetados com LPS começaram a subir por volta de 1.5 a 2 horas após a injeção de LPS no periodonto e a resposta febril foi caracterizada como bifásica. O primeiro pico se deu por volta de 150 minutos após a injeção e o segundo pico após 240 minutos da injeção. O platô (maior valor médio alcançado pelas médias das temperaturas dos animais do grupo experimental) se deu por volta de 4 horas após a injeção e alcançou um valor médio em torno de 38.0 °C.

No segundo dia de injeção de LPS a resposta febril apareceu um pouco mais precoce, por volta de 50 minutos após a injeção e com um padrão levemente alterado, o platô se deu por volta de 2.5 horas após a injeção e o valor médio da temperatura em torno de 37.7 °C [$F(1,24)=18.53$, $P<0.001$].

No terceiro dia de injeção de LPS no periodonto a resposta febril foi completamente abolida, os animais injetados com LPS mantiveram suas temperaturas corporais constantes, sem diferença estatística com o grupo controle que receberam somente solução salina estéril e apirogênica [$F(1,24)=0.34$, $P=0.56$], caracterizando o desenvolvimento da tolerância ao LPS no periodonto no terceiro dia consecutivo de injeção de LPS.

Fig. 1

Figura 1: Resposta da temperatura corporal de ratos a injeção repetida de solução salina ou LPS (100 µg/kg) nos tecidos periodontais de proteção em 3 dias consecutivos. O número de animais por grupo está mostrado entre parênteses. Valores são média ± erro (* $p < 0.05$ comparado com o grupo tratado com solução salina).

4.3 EFEITO DO L-NMMA SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL DE RATOS EM ANIMAIS TOLERANTES AO LPS.

A Figura 2 mostra o efeito do pré-tratamento com L-NMMA injetado i.c.v na tolerância induzida por LPS nos tecidos periodontais de ratos. No primeiro dia, a injeção de LPS (100 µg/kg) elicitou uma resposta febril tipicamente bifásica [$F(28,587) = 5.66$, $P < 0.001$] comparada com os animais controle tratados com salina estéril e apirogênica. No segundo dia, ratos tratados com LPS no periodonto apresentaram uma alteração no padrão da resposta febril, que passou a ser monofásica ao invés de bifásica e teve o início da resposta mais precoce que no primeiro dia, [$F(28,587) = 3.41$, $P < 0.001$] comparados com o grupo tratado com solução salina. Além disso, a resposta febril alcançou valores mais baixos no segundo dia, com platô se dando aproximadamente 2 horas após a injeção com valor máximo de temperatura de aproximadamente 37.8 °C, comparando com o primeiro dia, no qual o platô se deu por volta de 3 horas após a injeção, com valores máximos alcançando a faixa de 38.4 °C.

No terceiro dia de injeção de LPS nos tecidos periodontais, nos ratos pré-tratados com L-NMMA i.c.v., a resposta febril foi observada de forma similar ao primeiro dia de injeção de LPS, ao contrário dos ratos controle, pré-tratados com solução salina, também via intracerebroventricular, os quais desenvolveram a tolerância ao LPS e não apresentaram resposta febril (dados não estão na figura) [$F(31,357) = 4.20$, $P < 0.001$]. Animais controle, pré-tratados com salina no periodonto e L-NMMA ou salina i.c.v. não apresentaram nenhum efeito na temperatura corporal. These results showed the participation of nitric oxide in LPS-induced tolerance in the oral tissues of rats.

Desta forma, os resultados mostram que o óxido nítrico participa da tolerância induzida por LPS nos tecidos periodontais de ratos, pois no grupo experimental tratado com L-NMMA, inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, foi observada uma completa reversão da tolerância no terceiro dia e os animais voltaram a apresentar um aumento na temperatura corporal.

Fig. 2

Figura 2: Temperatura corporal de ratos injetados com salina ou LPS (100 µg/kg) nos tecidos periodontais, em 3 dias consecutivos, e L-NMMA i.c.v. 30 min antes no terceiro dia. O número de animais por grupo está mostrado entre parênteses. Valores são média ± erro (* $p < 0.05$ comparado com o grupo tratado com solução salina).

4.4 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS IMUNORREATIVA NO SUBNÚCLEO CAUDAL DO NÚCLEO TRIGEMINAL ESPINHAL APÓS ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERIODONTO DE RATOS, NO PRIMEIRO E TERCEIRO DIAS DE INJEÇÕES E INJEÇÃO i.c.v. DE L-NMMA NO TERCEIRO DIA.

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 no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal.

No grupo tratado com LPS (100 µg/kg) no primeiro dia de injeção, neurônios Fos positivos foram encontrados bilateralmente no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal 3 horas após a injeção de LPS (Figura 3 A1.2). No grupo controle (tratados com salina) (Figura 3 A1.1), o número de neurônios Fos positivos foi significativamente menor que o observado no grupo tratado com LPS ($p < 0.05$) no primeiro dia. No segundo dia de tratamento com LPS observamos uma pequena redução no número de neurônios marcados (dados não mostrados nas fotomicrografias). Já no terceiro dia de tratamento com LPS observamos uma grande redução no número de neurônios Fos positivos no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal (Figura 3 A2.2) ($p < 0.05$) comparados com os que receberam LPS no primeiro dia. Já no grupo experimental tratado com L-NMMA, inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, 30 minutos antes do LPS no terceiro dia foi observado uma completa reversão da tolerância no terceiro dia e neurônios Fos positivos foram amplamente detectados no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal nos animais que receberam LPS (Figura 3 A3.2), com diferença estatisticamente significativa do grupo que recebeu salina i.c.v. e LPS no periodonto no terceiro dia ($p < 0.05$), que se mantiveram com poucos neurônios marcados, pois desenvolveram tolerância. Os controles que receberam salina no periodonto não apresentaram quantidades significantes de neurônios Fos positivos (Figura 3 A1.1, A 2.1, A 3.1),. O controle negativo da imunohistoquímica não revelou nenhum neurônio marcado.

Fig. 3

Figura 3. Fotomicrografias do **subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal** mostrando neurônios marcados com a proteína Fos após injeção de LPS (100 µg/kg) ou salina no periodonto (dias 1 e 3) e L-NMMA ou salina (i.c.v. - dia 3).

A1.1 – salina periodonto dia 1,

A1.2 – LPS periodonto dia 1,

A2.1 – salina periodonto + salina i.c.v dia 3,

A2.2 – LPS periodonto + salina i.c.v dia 3,

A3.1 – salina periodonto + L-NMMA i.c.v. dia 3,

A3.2 – LPS periodonto + L-NMMA i.c.v dia 3.

4.5 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS IMUNORREATIVA NA ÁREA PRÉ-ÓPTICA DO HIPOTÁLAMO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERIODONTO DE RATOS, NO PRIMEIRO E TERCEIRO DIAS DE INJEÇÕES E INJEÇÃO i.c.v. DE L-NMMA NO TERCEIRO DIA.

Na área-pré-óptica do hipotálamo (POA) os achados através da técnica de imunohistoquímica foram semelhantes aos encontrados no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal, 3 horas após a injeção de LPS.

No grupo tratado com LPS (100 µg/kg) no primeiro dia de injeção, neurônios Fos positivos foram encontrados bilateralmente na POA 3 horas após a injeção de LPS (Figura 4 B1.2). No grupo controle (tratados com salina) (Figura 4 B1.1), o número de neurônios Fos positivos foi significativamente menor que o observado no grupo tratado com LPS ($p < 0.05$) no primeiro dia. No segundo dia de tratamento com LPS observamos uma pequena redução no número de neurônios marcados (dados não mostrados nas fotomicrografias). Já no terceiro dia de tratamento com LPS observamos uma grande redução no número de neurônios Fos positivos na POA (Figura 4 B2.2) ($p < 0.05$) comparados com os que receberam LPS no primeiro dia. Já no grupo experimental tratado com L-NMMA, inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, 30 minutos antes do LPS no terceiro dia foi observado uma completa reversão da tolerância no terceiro dia e neurônios Fos positivos foram amplamente detectados na POA nos animais que receberam LPS (Figura 4 B3.2), com diferença estatisticamente significativa do grupo que recebeu salina i.c.v. e LPS no periodonto no terceiro dia ($p < 0.05$), que se mantiveram com poucos neurônios marcados, pois desenvolveram tolerância. Os controles que receberam salina no periodonto não apresentaram quantidades significantes de neurônios Fos positivos (Figura 4 B1.1, B 2.1, B 3.1),. O controle negativo da imunohistoquímica não revelou nenhum neurônio marcado.

Fig. 4

Figura 4. Fotomicrografias da **área pré-óptica do hipotálamo** mostrando neurônios marcados com a proteína Fos após injeção de LPS (100 µg/kg) ou salina no periodonto (dias 1 e 3) e L-NMMA ou salina (i.c.v. - dia 3).

B1.1 – salina periodonto dia 1,

B1.2 – LPS periodonto dia 1,

B2.1 – salina periodonto + salina i.c.v dia 3,

B2.2 – LPS periodonto + salina i.c.v dia 3,

B3.1– salina periodonto + L-NMMA i.c.v. dia 3,

B3.2 – LPS periodonto + L-NMMA i.c.v dia 3.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS IMUNORREATIVA NO SUBNÚCLEO CAUDAL DO NÚCLEO TRIGEMINAL ESPINHAL E NA ÁREA PRÉ-ÓPTICA DO HIPOTÁLAMO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERIODONTO DE RATOS, NO PRIMEIRO E TERCEIRO DIAS DE INJEÇÕES E INJEÇÃO i.c.v. DE L-NMMA NO TERCEIRO DIA.

Na Figura 5 podemos observar a quantificação dos neurônios marcados com a proteína Fos no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal (A) e da área pré-óptica do hipotálamo (B) após injeção de LPS (100 µg/kg) ou salina no periodonto (dias 1 e 3) e L-NMMA ou salina (i.c.v. - dia 3).

Ambas as áreas (subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal e POA) apresentaram o mesmo padrão de resposta frente à contagem de neurônios Fos positivos.

No primeiro dia de injeção de LPS no periodonto foram detectadas uma média de 200 células Fos positivas em ambas as áreas no grupo que recebeu LPS nos tecidos periodontais, já nos grupos controle, tratados com salina, quantidades insignificantes de neurônios marcados foram visualizados ($p < 0.05$).

No terceiro dia de injeção de LPS no periodonto, nos animais que receberam salina i.c.v., detectamos uma redução do número de neurônios Fos positivos em ambas as áreas, caracterizando a ocorrência da tolerância, uma média de 60 células foram detectadas nos animais que receberam LPS e novamente quantidade insignificante de neurônios marcados foram visualizados nos animais controle, que receberam salina no periodonto ($p < 0.05$).

Já no grupo que recebeu L-NMMA i.c.v. e LPS no periodonto no terceiro dia, observamos uma completa reversão da tolerância e uma média de 400 células Fos positivas foram detectadas no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal e 340 células na POA foram contadas, com diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo que recebeu salina i.c.v. e LPS no periodonto no terceiro dia ($p < 0.05$).

Fig. 5

Figura 5. Quantificação dos neurônios marcados com a proteína Fos no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal (A) e da área pré-óptica do hipotálamo (B) após injeção de LPS (100 µg/kg) ou salina no periodonto (dias 1 e 3) e L-NMMA ou salina (i.c.v. - dia 3).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Súmula dos resultados

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que injeções repetidas de LPS em dias consecutivos nos tecidos periodontais de ratos levam ao desenvolvimento de tolerância ao LPS no terceiro dia. Esta tolerância se expressa através de uma atenuação da resposta febril dos animais no segundo dia de tratamento com LPS e de uma completa abolição desta resposta no terceiro dia de tratamento. Além disso, através da investigação da expressão de *c-fos* nossos resultados mostraram pela primeira vez na literatura uma atenuação, no terceiro dia, da ativação neuronal no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal, local onde o nervo trigêmio faz sua primeira sinapse, e na área pré-óptica do hipotálamo, área responsável pela integração da informação térmica no Sistema Nervoso Central, em resposta as injeções locais repetidas de LPS nos tecidos periodontais, confirmando, desta forma, o desenvolvimento de tolerância.

Os resultados mostraram também que o óxido nítrico participa do mecanismo de tolerância ao LPS no periodonto de ratos, pois, injeção central de L-NMMA, antes da injeção local de LPS no terceiro dia, reverteu o mecanismo de tolerância e os animais apresentaram resposta febril. Além disso, através de imunohistoquímica, foi observado um aumento da ativação neuronal em ambas as áreas estudadas (subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal e POA) quando se injetou L-NMMA centralmente no terceiro dia, antes do LPS, confirmando, desta forma que a reversão do mecanismo de tolerância é controlada pelo Sistema Nervoso Central.

Dos resultados

Neste trabalho, foi injetado LPS localmente nos tecidos periodontais de proteção em três dias consecutivos para verificar o possível desenvolvimento de tolerância local ao LPS. A tolerância sistêmica induzida por LPS já foi descrita, principalmente por meio de uma alteração da resposta febril polifásica para uma resposta febril monofásica (Almeida *et al.*, 1999; Soszynski *et al.*, 1991; Wilkinson and Kasting, 1990), enquanto que em camundongos ela se expressa através de uma atenuação da resposta febril (Dias *et al.*, 2005). No presente estudo, a tolerância ao LPS, injetado nos tecidos periodontais de proteção de ratos, caracterizou-se no segundo dia de tratamento por LPS, por uma modificação no padrão da resposta febril, e no terceiro dia de tratamento por LPS, por uma completa abolição da resposta febril (Figura 1). As diferentes vias de administração do LPS pode ser uma das razões para se explicar essas diferenças. Adicionalmente, Rudaya *et al.* (2005), recentemente mediram as respostas termoregulatórias ao LPS em camundongos e interessante concluíram que na pesquisa com termoregulação, cuidados devem ser tomados na administração de LPS, como realizar um experimento livre de estresse ao animal e executar os experimentos em um ambiente com temperatura ambiente controlada, para que se obtenham resultados fiéis das intrigantes respostas ao estímulo por LPS.

Recentemente, tem havido um aumento no interesse do entendimento dos mecanismos responsáveis pela alteração das respostas frente ao estímulo por endotoxina bacteriana, em função de que a habilidade de um animal em se tornar tolerante ao LPS é crucial para se ter um controle das respostas inflamatórias e garantir a sobrevivência dos organismos (Lindberg *et al.*, 1983). A tolerância tem sido extensivamente estudada, utilizando-se repetidas administrações intra-peritoniais ou intravenosas de LPS em curtos intervalos de tempo (cf. Beeson, 1947). O desenvolvimento de tolerância ao LPS parece ser um importante mecanismo na produção de respostas inflamatórias controladas e um importante mecanismo no choque séptico (Freudenberg *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 2000). Animais tolerantes exibem respostas menos pronunciadas a doses não letais de LPS e também sobrevivem a doses de LPS que

geralmente seriam letais. (Freudenberg *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 2000). A indução de tolerância representa um mecanismo profilático altamente efetivo contra a mortalidade no choque endotóxico (Freudenberg *et al.*, 1998).

Porém a investigação da tolerância local ao LPS, na cavidade oral nunca foi estudada antes *in vivo*. A tolerância a endotoxina na cavidade bucal já foi previamente estudada *in vitro*, com cultura celular de monócitos e macrófagos (Shnyra *et al.*, 1998; Muthukuru *et al.*, 2005). Células monocíticas humanas foram pré-tratadas com baixas doses de LPS e apresentaram uma produção de citocinas alterada em função do estímulo por LPS (Seatter *et al.*, 1995; West and Heagy, 2002), em particular, apresentaram uma redução na produção do TNF (fator de necrose tumoral) (Seatter *et al.*, 1995). Além disso, a tolerância na mucosa oral tem sido relacionada com a inibição da resposta dos antígenos e tem sido associada com a redução na regulação da expressão dos receptores celulares como os receptores “Toll like”, CD14, entre outros (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2002). Tlaskalova-Hogenova *et al.* (2002) consideraram que em modelos experimentais, uma alta colonização protetiva da superfície da mucosa por microorganismos comensais, tem um importante efeito estimulatório no desenvolvimento pós-natal das respostas imunológicas, processos metabólicos (por exemplo a nutrição) e outras atividades do hospedeiro; estas respostas imunológicas locais e sistêmicas são tardiamente substituídas por inibição, por exemplo, por indução de tolerância na mucosa oral. Nós podemos especular que esses mecanismos podem também estar presentes em nosso modelo experimental.

Até o momento, está claro que a tolerância a endotoxina é uma resposta adaptativa. Em humanos a periodontite crônica, caracterizada pela destruição das estruturas de suporte dental, ocorre ou por ação das bactérias ou de seus subprodutos, como o LPS (Zdarilová *et al.*, 2009). O LPS na cavidade oral é um forte indutor da resposta inflamatória local e de reabsorção óssea alveolar (Jotwani *et al.*, 2001).

Além da resposta termoregulatória, nós verificamos, por meio de imunohistoquímica para a proteína Fos, uma atenuação da ativação neuronal em ambas as áreas estudadas (subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal e POA (Figura 3 A2.2 e Figura 4 B2.2) após repetidas administrações de LPS nos tecidos periodontais, também confirmando a ocorrência de tolerância

induzida por LPS nos tecidos periodontais de proteção. Em relação à microbiota, as bactérias gram negativas predominam na doença periodontal moderada e severa, apresentando, desta forma, grandes quantidades de LPS em sua parede bacteriana (Kamma *et al.*, 1994).

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), inflamação pulpar induzida por LPS em furão (Chattipakorn *et al.*, 2002) e por injeção única de LPS no periodonto (Navarro *et al.*, 2006). 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 espinal, desta forma similar aos resultados obtidos nos nossos experimentos com injeção de LPS no periodonto de ratos (Figura 3). Muitos estudos têm mostrado que a parte caudal do núcleo trigeminal espinal, é um importante sítio que retransmite o “input” nociceptivo das estruturas orofaciais (Sessle, 1986), incluindo da dentição (Byers *et al.*, 2000). Além disto, tanto o estímulo nociceptivo como a febre são processos que fazem parte da reação de fase aguda à infecção e a inflamação.

O mediador óxido nítrico vem sendo amplamente estudado em animais e humanos. O presente estudo também demonstrou que a via do NO participa do mecanismo de tolerância local ao LPS nos tecidos periodontais de ratos, uma vez que a administração i.c.v. do inibidor da NOS, L-NMMA, potencializou a resposta febril ao LPS no terceiro dia em animais tolerantes.

A identificação do NO como sendo um dos *fatores relaxantes derivados do endotélio* (EDRFs) foi o marco inicial para o surgimento de evidências que atestam que este composto gasoso é uma molécula sinalizadora importante em

diversos processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo a termorregulação e febre (Steiner & Branco, 2001; Gerstberger, 1999).

Existe uma variedade de estudos relacionados ao papel do NO na termorregulação e febre. Nesses estudos, diversos doadores de NO, bem como inibidores da NOS foram utilizados por diferentes vias de administração em diferentes espécies animais. Os resultados desses estudos favorecem a hipótese de que a função termorreguladora do NO depende do seu sítio de ação. Dessa forma, periféricamente, o NO parece ter ação predominantemente pirética (Perotti *et al.*, 1999; Reimers *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998b; Kozak & Kozak 2003; Scammel *et al.*, 1996), enquanto que centralmente, o NO parece agir como molécula antipirética (Almeida *et al.*, 1999; De Paula *et al.*, 2000; Gourine, 1995; Steiner *et al.*, 2002). Periféricamente, os efeitos do NO parecem estar relacionados à sua ação direta nos tecidos termorreguladores e não na sinalização febrinogênica ao encéfalo (Steiner *et al.*, 2004). Nesse sentido, sabe-se que o NO pode alterar a termorregulação por meio da ação tanto no tecido adiposo marrom, alterando a produção de calor (Monda *et al.*, 1995; Nagashima *et al.*, 1994), quanto no músculo liso vascular, alterando a perda ou conservação de calor através da pele (Taylor & Bishop, 1993). Ainda, a ação do NO parece depender do mecanismo termorregulador efetor proeminente na espécie testada. Essa idéia está baseada no fato de que a administração periférica de doadores de NO aumentam o fluxo sanguíneo cutâneo (*c.f.* Gerstberger, 1999), enquanto que inibidores da NOS reduzem a atividade simpática ao tecido adiposo marrom de ratos, evidenciando a ação pirética do NO na periferia. Por outro lado, em contraste com os dados obtidos em ratos, coelhos tratados sistemicamente com L-NAME apresentam aumento na T_c, associada à diminuição na dissipação de calor pela respiração (Mathai *et al.*, 1997).

Estudos anteriores verificaram a participação do NO na tolerância ao LPS em ratos (Almeida *et al.*, 1999; Soszynsky, 2002) e coelhos (Gourine, 1995). Em camundongos o NO também tem papel importante na tolerância, pois quando animais tolerantes foram tratados com L-NMMA sistêmico foi observado uma reversão do mecanismo de tolerância e os camundongos desenvolveram resposta febril (Dias *et al.*, 2005). No entanto, o papel do NO na tolerância local ao LPS nos tecidos periodontais nunca tinha sido avaliado.

Desta forma, em nosso estudo, injeção central de L-NMMA antes da injeção local de LPS no periodonto no terceiro dia reverteu a tolerância e os animais desenvolveram resposta febril no terceiro dia (Figura 2). Acompanhando essa resposta, a imunohistoquímica mostrou que o L-NMMA também reverteu a redução da marcação neuronal pela proteína Fos no terceiro dia e a atividade neuronal aumentou quando inibimos a produção do NO por essa droga (Figura 2 A3.2 e Figura 3 B3.2). Esses resultados quando analisados juntos, são um indicativo de que o NO central participa do mecanismo de tolerância induzida por LPS nos tecidos periodontais de ratos, por modular a integração da regulação da temperatura, independente da manutenção do estímulo. Além disso o subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal e POA, sítios alvo para a regulação da temperatura corporal após injeção de LPS nos tecidos periodontais, constituem importantes centros mediando ação do NO na termoregulação.

Além disso, também pode ser especulado que a produção do NO central pode estar aumentada com o desenvolvimento da tolerância ao LPS na cavidade oral, que pode contribuir para a redução da resposta febril. Suportando essa hipótese temos que injeção i.c.v. do inibidor da enzima NOS (L-NMMA) aboliu a tolerância a endotoxina no terceiro dia de LPS (Figura 2).

Trabalhos recentes investigam o efeito do NO exógeno na resposta imune induzida por LPS em modelo de injeção subcutânea e sugerem que o óxido nítrico exógeno pode suprimir a resposta imune local e retardar o processo de cicatrização de lesões subcutâneas (Sosroseno *et al.*, 2009). Desta forma, há um interesse crescente dos pesquisadores em se entender as diferentes funções do mediador gasoso NO, molécula que participa de diversas funções fisiológicas e patológicas e nosso corpo e que ainda não está totalmente elucidada.

Extrapolando nossos resultados para o que é observado na clínica, é interessante notar que uma resposta febril evidente foi observada após injeção de LPS nos tecidos periodontais de ratos no primeiro dia, mas não no terceiro dia de injeção de LPS, em função do desenvolvimento do mecanismo de tolerância. Como regra geral, em pacientes, a periodontite crônica não vem acompanhada de febre, apesar da grande quantidade de LPS bacteriano estar presente nas bolsas periodontais, porém em casos de doença periodontal

aguda, como por exemplo, o abscesso periodontal agudo, geralmente vem acompanhado por quadro febril (Katz *et al.*, 1992, Fukai *et al.*, 1989 e Schroder, 1979). Nossos resultados sugerem que o que ocorre na periodontite crônica é o desenvolvimento da tolerância ao LPS nas bolsas periodontais, desta forma, tornando esta doença praticamente assintomática e dificultando desta forma, a busca do tratamento pelos pacientes acometidos.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a presença crônica de endotoxina na cavidade bucal, mais especificamente no periodonto de proteção, promoveu o desenvolvimento do mecanismo de tolerância ao LPS, mecanismo já descrito sistemicamente, mas até o momento, desconhecido na cavidade bucal. Além disto, foi verificado que esse mecanismo de tolerância é controlado pelo Sistema Nervoso Central, através da significativa redução da expressão da proteína Fos no subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal e na POA em animais tolerantes.

Nossos dados indicaram também que o NO participa do desenvolvimento desse mecanismo de tolerância na cavidade bucal, pois com a utilização de inibidor inespecífico da NOS observamos uma completa reversão da tolerância no terceiro dia e os animais voltaram a apresentar resposta febril.

Na abordagem imunohistoquímica foi verificado também que a principal área responsável pelo controle central da temperatura (área pré-óptica do hipotálamo) e o subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinal (subnúcleo que apresenta fibras de passagem do nervo trigêmio), apresentaram um aumento da expressão de *c-fos* induzido por LPS em animais tolerantes, quando pré-tratados centralmente com o inibidor da enzima NOS.

Os dados deste trabalho sugerem que o mecanismo de tolerância local na boca pode, eventualmente, mediar às mesmas regiões cerebrais (principalmente a POA) após o sinal ser processado pelo nervo trigêmio e pela parte caudal do núcleo trigeminal espinal. Desta forma, estes achados adicionaram o novo papel do NO mediando à tolerância a endotoxina na cavidade bucal, estando de acordo com trabalhos prévios que indicam que o NO tem um importante papel na termoregulação, febre e também mediando à tolerância induzida por LPS sistemicamente.

É sabido que os tecidos periodontais de pacientes estão constantemente sendo infectados por patógenos e seus subprodutos, como o LPS, desta forma, a tolerância na mucosa oral deve estar presente como forma de manter o balanço em tecidos constantemente infectados. Além disto, o mecanismo de tolerância pode explicar o fato de que de forma geral, a periodontite crônica não vem acompanhada por febre em pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAMSON, L. Subacute bacterial endocarditis following removal of septic foci. *British Medical Journal*. 2: 8-9, 1931.
2. ALMEIDA, M.C., TREVISAN, F.N., BARROS, R.C.H., CARNIO, E.C., BRANCO, L.G.S. Tolerance to lipopolysaccharide is related to the nitric oxide pathway. *Neuroreport*. 10: 1-5, 1999.
3. ALT, H. L., BARKER M. H., Fever of unknown origin. *Journal of the American Medical Association*. 94: 1457-61, 1930.
4. ATAOGU, H, M.D. DOGAN, F. MUSTAFA, & E.S. AKARSU. Candida albicans and saccharomyces cerevisiae cell wall mannans produce fever in rats: role of nitric oxide and cytokines. *Life Sci*. 67: 2247-2256, 2000.
5. BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; BROADWELL, R. D. Passage of cytokines across the blood brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, v. 2, n. 4, p. 241-248, 1995.
6. BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.
7. BEESON, P.B. Tolerance to bacterial pyrogens. Factors influencing in development. *J. of Experimental Medicine* 86: 29-38, 1947.
8. BERNHEIM, H. A.; KLUGER, M. J. Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival. *Science*, v. 193, n. 4249, p. 237-239, 1976.
9. BERRY, E., SILVER, J. Pyorrhoea as a cause of pyrexia. *British Medical Journal*. 2: 1289-90, 1976.
10. BLATTEIS, C.M. & SEHIC, E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain. *NIPS* 12: 1-9, 1997.
11. BLATTEIS, C.M. & SEHIC, E. Cytokines and fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840: 608-18, 1998.
12. BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E.; LI, S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. S168-S177, 2000.
13. BRYANT, R. E.; HOOD, A. F.; HOOD, C. E.; LOENIG, M. G. Factors affecting mortality of gram-negative rod bacteremia. *Arch. Intern. Med.*, v. 127, n. 1, p. 120-128, 1971.

14. BOROWSKY, S.A., HASSE, A., WIEDLIN, R. LOTT, E. Dental infection in a cirrhotic patient. *Gastroenterology* 76, 836-9, 1979.
15. BOULANT, J. A. Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. S157-S161, 2000.
16. BOYD, D. L., KATZ, V., FERTIK, G. S., OFFENBACHER, S., Relationship between periodontal disease status and birth outcome. *Journal of Dental Research*. 73: 394, 1994.
17. BREDT D.S., P.M. HWANG, C.E. GLATT, C. LOWENTEN, R.R. REED, & S.H. SNYDER. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718, 1991.
18. BYERS, M.R., CHUDLER, E.H., IADAROLA, M.J. Chronic tooth pulp inflammation causes transient and persistent expression of fos in dynorphin-rich regions of rat brainstem. *Brain Res*. 861: 191–207, 2000.
19. CÁRNIO, E.C. & BRANCO, L.G.S. Participation of the nitric oxide pathway in cold-induced hypertension. *Life Sciences* 60: 1875-1880, 1997.
20. CARTMELL, T., BALL, C., BRISTOW, A. F., 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*. 549.2: 653-664, 2003.
21. CHATTIPAKORN, S.C., SIGURDSSON, A., LIGHT, A.R., NARHI, M., MAIXNER, W. Trigeminal *c-fos* expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. *Pain*. 99: 61–69, 2002.
22. CHEMA, A., FRAIFELD, V., ADAMOVICH, L., SOD-MORIAH, U.A. & KAPLANSKI, J. Tolerance to lipopolysaccharide is not related to the ability of the hypothalamus to produce prostaglandin E₂. *Life Sciences* 61 (8): 813-818, 1997.
23. CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; GOLENBOCK, D. T.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 16, p. 10689-10692, 1999.
24. 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*. 173: 201-4, 1994.
25. COOPER, K.E., KASTING, N.W., LEDERIS, K. & VEALE, W.L. Evidence supporting the role of endogenous vasopressin in natural suppression of fever in the sheep. *J. Physiol*. 295: 33-45, 1979.

26. DALAND, J. Focal sepsis. *New York Medical Journal*. 103: 1159-60, 1916.
27. DAWSON, T.M., & S.H. SNYDER. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci*. 14(9): 5147-5159, 1994.
28. DE PAULA, D., A.A. STEINER, & L.G.S. BRANCO. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. *Physiol. Behav.* 70:505-511; 2000.
29. DELEO, A. A., SCHOENKNECHT, F. D., ANDERSON, M. W., PETERSON, J. C. The incidence of bacteremia following oral prophylaxis on pediatric patients. *Oral Surgery. Oral Medicine and Oral Pathology*. 37, 36-45, 1979.
30. DIAS, M.B., ALMEIDA, M.C., CÁRNIO, E.C., BRANCO, L.G.S. Role of nitric oxide in tolerance to lipopolysaccharide in mice. *J Appl Physiol*. 98: 1322-1327, 2005.
31. DOWNING, J. F.; TAYLOR, M. W.; WIE, K. M.; ELIZONDO, R. S. In vivo hyperthermia enhances plasma antiviral activity and stimulates peripheral lymphocytes for increased synthesis of interferon gamma. *J. Interferon Res.*, v. 7, n. 2, p. 185-193, 1987.
32. EISENBUD, L. Subacute bacteria endocarditis precipitated by non surgical dental procedures. *Oral Surgery. Oral Medicine and Oral Pathology*. 15: 624-7, 1962.
33. ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *TINS* v. 20, n. 12, p. 565-569, 1997.
34. ERROI, A.; FANTUZZI, G.; MENGOZZI, M.; SIRONI, M.; ARENCOLE, S. F.; CLARK, B. D.; DINARELLO, C. A.; ISETTA, A.; GNOCCHI, P.; GIOVARELLI, M.; GHEZZI, P. Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 10, p. 4356-4359, 1993.
35. FREUDENBERG, M. A.; SALÔMAO, R.; SING, A.; MITOV, I.; GALANOS, C. Reconciling the concepts of endotoxin sensitization and tolerance. *Progr. Clin. Biol. Res.*, v. 397, p. 261-268, 1998.
36. 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): 1242-53, 1989.
37. FURCHGOTT R.F., & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.

38. GARIBALDI, J. A. Influence of temperature on the biosynthesis of iron transport compounds by *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, v. 110, n. 1, p. 262-265, 1972.
39. GEIGER, A. J. Relation of fatal subacute bacterial endocarditis to tooth extraction. *Journal of the American dental Association*. 29: 1023-5, 1942.
40. GERSTBERGER, R. Nitric Oxide and body temperature control. *News Physiol. Sci.*, v. 14, p. 30-36, 1999.
41. GILMER, T.L. A clinical and experimental study of chronic alveolar abscess in relation to systemic disorders. *Dental Cosmos*. 58:1357-62, 1916.
42. GLAUERT, A. M.; THORNLEY, M. J. The topography of the bacterial cell wall. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 23, p. 159-198, 1969.
43. GOADBY, K. W. The association of disease of the mouth with rheumatoid arthritis and certain other forms of rheumatism. *Lancet*. 1: 639-49, 1911.
44. GOURINE, A.V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. *Gen. Pharmacol.* 26: 835-841, 1995.
45. GRIEGER, T. S.; KLUGER, M. J. Fever and survival: the role of serum iron. *J. Physiol. Lond.*, v. 279, p. 187-196, 1978.
46. GRIFFITH, O.W., & D.J., STUERH. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 707-736, 1995.
47. HASDAY, J. D.; GARRISON, A. Antipyretic therapy in patients with sepsis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. S234-S241, 2000.
48. HEDSTROM, S. A., NORD, C. E., URSING, B. Chronic meningitis in patients with dental infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 12: 117-21, 1980.
49. HERON, I.; BERG, K. The actions of interferon are potentiated at elevated temperature. *Nature Lond.*, v. 274, p. 508-10, 1978.
50. 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.* V. 162, n. 7, p. 3749-1752, 1999.
51. HUNT, S. P., PINI, A., EVAN, G. Induction of *c-fos* like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*. 328, 632-4, 1987.
52. HUNTER W. The coming of age of oral sepsis. *British Medical Journal*. 1:859, 1921.

53. IVANOV, A.I., KULCHITSKY, V.A., SUGIMOTO, N., SIMONS, T., ROMANOVSKY, A.A. Does the formation of lipopolysaccharide tolerance require intact vagal innervation of the liver? *Autonomic Neuroscience* 85: 111-118, 2000.
54. JOTWANI, R., PALUCKA, A.K., AL-QUOTUB, M., NOURI-SHIRAZI, M., KIN, J., BELL, D. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J. Immunol.* 167, 4693–4700, 2001.
55. KAMMA, J.J., NAKOU, M., MANTI, F.A. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J. Periodontol.* 65, 1073–1078, 1994.
56. KAMERMAN, P., & A. FULLER. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the febrile response to lipopolysaccharide and muramyl dipeptide in guinea pigs. *Life Sci.* 67: 2639-2645; 2000.
57. KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 18, p. 621-663, 2000.
58. KATZ, J., WEINSTEIN, E., BARAK, S., LIVNEH, A. Dental disease in the differential diagnosis of fever of unknown origin. *Annals of Dentistry.* 51: 3-5, 1992.
59. KLUGER, M.J. Fever: Role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 71 (1): 93-127, 1991.
60. KLUGER, M. J.; RINGLER, D. H.; ANVER, M. R. Fever and survival. *Science*, v. 188, n. 4184, p. 166-168, 1975.
61. KOZAK, W.; KOZAK, A. Genetic models in applied physiology selected contribution: differential role of nitric oxide synthase isoforms in fever of different etiologies: studies using NOS gene-deficient mice. *J. Appl. Physiol.*, v. 94, n. 6, p. 2534-2544, 2003.
62. KURIMOTO, T., TACHIBANA, C., SUZUKI, M., WATANABE, T. Biological and chemical characterization of lipopolysaccharide from *Selenomonas* spp. In human periodontal pockets. *Infect Immun.* 51(3): 969-71, 1986.
63. LATRONICA, R. J., SHUKES, R. Septic emboli and pulmonary abscess secondary to odontogenic infection. *Journal of oral Surgery.* 31:844-7, 1973.
64. LEHNER, M. D.; ITTNER, J.; BUNDSCHUH, D. S.; VAN ROOIJEN, N.; WENDEL, A.; HARTUNG, T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection despite attenuated cytokine response. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 1, p. 463-471, 2001.

65. LEON, P.; REDMOND, H. P.; SHOU, J.; DALY, J. M. Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Arch. Surg.*, v. 127, n. 2, p. 146-151, 1992.
66. LEVINSON, S. L., BARONDESS, J. A. Occult dental infection as cause of fever of obscure origin. *Americam Journal of Medicine*. 66: 463-7, 1979.
67. LINDBERG, A. A.; ROBERTSSON, J. A. *Salmonella typhimurium* infection in calves: cell-mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. *Infect. Immun.*, v. 41, n. 2, p. 751-757, 1983.
68. MACKOWIAK, P. A.; BROWNE, R. G.; SOUTHERN, P. M.; SMITH, J. W. Polymicrobial sepsis: an analysis of 184 cases using log linear models. *Am. J. Med. Sci.*, v. 280, n. 2, p. 73-80, 1980.
69. MAGDALENA, C. M., NAVARRO, V.P., PARK, D.M., STUANI, M. B. S., ROCHA, M. J. A. c-fos Expression in the rat brain nuclei following incisor tooth movement. *J Dental Res*. 83: 50-54, 2004.
70. MALKINSON, T.J., GRIGES, T.E., LEDERIS, K. & VEALI, W.L. Perfusion of the septum of the rabbit with vasopressin antiserum enhances endotoxin fever. *Pept*. 8: 385-389, 1987.
71. MATHAI, M. L.; HJELMQVIST, H.; KEIL, R.; GERSTBERGER, R. Nitric oxide increases cutaneous and respiratory heat dissipation in conscious rabbits. *Am. J. Physiol.*, v. 272, n. 6 Pt 2, p. R1691-7, 1997.
72. MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E.; STADLEN, A.; CHEN, C.; GHOSH, S.; JANEWAY, C. A. JR. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell.*, v. 2, n. 2, p. 253-258, 1998.
73. MEURMAN, J. H. Dental infections and general health. *Quintessence International*. 28: 807-11, 1997.
74. MILLER, A. J., LUHESHI, G. N., ROTHWELL, N. J., HOPKINS, S. J. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *American Journal Physiology*. 272(3Pt2): R857-61, 1997.
75. MILTON, A. S. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. *Ann. NY. Acad. Sci.*, v. 559, p. 392-410, 1989.
76. MONCADA, S., PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-141, 1991.

77. MONDA, M.; AMARO, S.; SULLO, A.; DE LUCA, B. Nitric Oxide reduces body temperature and sympathetic input to brown adipose tissue during PGE₁-hyperthermia. *Brain. Res. Bull.*, v. 38, n. 5, p. 489-493, 1995.
78. MORGAN, J. I. & CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *TINS* 12(11), 459-62, 1989.
79. MURRAY, C. A., & SAUNDERS, W. P., Root canal treatment and general health; a review of the literature. *International Endodontic Journal*. 33: 1-18, 2000.
80. MUTHUKURU, M., JOTWANI, R., CUTLER, C. W. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infec and Immunity* 73(2), 687-94, 2005.
81. NAGASHIMA, T.; OHINATA, H.; KUROSHIMA, A. Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. *Life Sci.*, v. 54, n. 1, p. 17-25, 1994.
82. NAHAS, G. G.; TANNIERES, M. L.; LENNON, J. F. Direct measurement of leukocyte motility: effects of pH and temperature. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 138, n. 1, p. 350-352, 1971.
83. NAVA, F., CARTA, G. Repeated lipopolysaccharide administration produces tolerance to anorexia and fever but not to inhibition of thirst in rat. *Int. J. Immunopharmacol.* 22(11): 943-53, 2000.
84. NAVARRO, V.P., IYOMASA, M.M., LEITE-PANISSI, C.R.A., BRANCO, L.G. New role of trigeminal nerve as a thermoafferent neuronal pathway signaling brain in acute periodontitis: participation of local prostaglandins. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 453: 73–82, 2006.
85. NAVARRO, V.P., ROCHA, M.J.A, BRANCO, L.G.S. Reduced central *c-fos* expression and the febrile response to repeated LPS injection into the periodontal tissue of rats. *Brain Res.* 1152: 57- 63, 2007.
86. NAVAZESH, M., MULLIGAN, R., SOBEL, S. Toxic shock and Down Syndrome in a dental patient: a case report and review of the literature. *Special Care in Dentistry*. 15, 11-9, 1995.
87. NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, v. 49, n. 1, p. 1-32, 1985.
88. OFFENBACHER, S., KATZ, V., FERTIK, G. S., COLLINS, J.G., BOYD, D. L., MAYNOR, G.B., Periodontal infection as a risk factor for pre-term low birth weight. *Journal of Periodontology*. 67: 1103-13, 1996.
89. PAXINOS, G., WATSON., C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, 1998.

90. PEROTTI, C. A. A., NOGUEIRA, M. S., ANTUNES-RODRIGUES, J., CÁRNIO, E. C. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. *Braz J. Med. Biol. Res.* 32(11): 1381-7, 1999.
91. PETERSDORF, R.G., BEESON, P. Fever of unexplained origin: a report of 100 cases. *Medicine.* 40: 1-30, 1961.
92. RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 71, p. 635-700, 2002.
93. RANDOW, F.; SYRBE, U.; MEISEL, C.; KRAUSCH, D.; ZUCKERMANN, H.; PLATZER, C.; VOLK, H. D. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.*, v. 181, n. 5, p.1887-1892, 1995.
94. REIMERS, J.I., U. BJERRE, T. MANDRUP-POULSEN, & J. NERUP. Interleukin 1 beta induces diabetes and fever in normal rats by nitric oxide via induction of different nitric oxide synthases. *Cytokine* 6(5): 512-520, 1994.
95. RIETSCHEL, E. T. & BRADE, H. Bacterial Endotoxins. *Scientific American.* Aug.: 26-33, 1992.
96. RIETSCHEL, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZAHNINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F.; SCHREIER, M.; BRADE, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.*, v. 8, n. 2, p. 217-225, 1994.
97. RISE, E., SMITH, J.F., BELL, J. Reduction of bacteremia after oral manipulations. *Archives of Otolaryngology.* 90:198-201, 1969.
98. ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SZÉKELY, M. Neural route of pyrogen signaling to the brain. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. S162-167, 2000.
99. ROMANOVSKY, A.A., ALMEIDA, M.C., ARONOFF, D.M., IVANOV, A.I., KONSMAN, J.P., STEINER, A.A., TUREK, V.F. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci* 10: 2193–2216, 2005.
100. 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.* 71; 305-13, 2000.
101. ROTH, J.; MCCLELLAN, J. L.; KLUGER, M. J.; ZEISBERGER, E. Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea pigs. *J. Physiol.*, v. 477, p. 177-185, 1994.

102. ROTH J., STORR, B., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates lipopolysaccharide-induced fever without reduction of circulating cytokines in guinea-pigs. *Pflugers Arch.* 436: 858-862, 1998.
103. ROTH, J.; STORR, B.; VOIGT, K.; ZEISBERGER, E. Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin 1-beta-induced fever in rats. *Life Sci.*, v. 62, n. 22, p. PL345-350, 1998b.
104. RUDAYA, A.Y., STEINER, A.A., JARED, R.R., DRAGIC, A.S., ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulatory response to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on dose and ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, 1244–1252, 2005.
105. SAPER, C. B.; BREDER, C. D. The neurologic basis of fever. *New. Eng. J. Med.*, v. 330, n. 26, p. 1880-1886, 1994.
106. SCAMMELL, T.E., J.K. ELMQUIST, & C.B. SAPER. Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *Am. J. Physiol.* 271: R333-R338, 1996.
107. SCHRODER, H. Therapeutic and diagnostic problems of generalized acute suppurative periodontitis marginalis profunda. *Dtsch Zahnarztl Z.* 34(6): 504-10, 1979.
108. SCONYERS, J. R., CRAWFORD, J.J., MORIARTY, J. D. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. *Journal of the American Dental Association.* 87: 616-22, 1973.
109. SEATTER, S.C., LI, M.H., BUBRICK, M.P. Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators. *Shock* 3, 252–258, 1995.
110. SESSLE, B.J. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J Endod.* 12: 435–444, 1986.
111. SHINODA, T., MIZUTANI, H., KANEDA, T., SUZUKI, M. Fever of unknown origin caused by dental infection. *Oral Surgery. Oral Medicine and Oral Pathology.* 64: 175-8, 1987.
112. SHNYRA, A.; BREWINGTON, R.; ALIPIO, A.; AMURA, C.; MORRISON, D. C. Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL-10 and IL-12. *J. Immunol.*, v. 160, n. 8, p. 3729-3736, 1998.
113. SIMINOSKI, K. Persistent fever due to occult dental infection: case report and review. *Clinical Infectious Diseases.* 16: 550-4, 1993.
114. SOSROSENO W, BIRD PS, SEYMOUR GJ. Effect of exogenous nitric oxide on murine immune response induced by *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans lipopolysaccharide. *J Periodontal Res.*, 44(4):529-536, 2009.

115. SOZYNSKI, D. The inhibition of nitric oxide synthase suppresses LPS- and psychological-stress-induced fever in rats. *Physiol. Behav.* 72(1-2): 65-72; 2001.

116. SOSZYNSKY, D. Inhibition of nitric oxide synthase delays the development of tolerance to LPS in rats. *Physiol. Behav.*, v. 76, n. 1, p. 159-169, 2002.

117. SOSZYNSKI, D.; KOZAK, W.; SZEWCZENKO, M. Course of fever response to repeated administration of sublethal doses of lipopolysaccharides, polyinosinic:polycytidylic acid and muramyl dipeptide to rabbits. *Experientia*, v. 47, n. 1, p. 43-47, 1991.

118. STEINER, A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M.; BRANCO, L. G. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. *American J. Physiol.*, v. 282, p. 584-593, 2002.

119. STEINER, A.A., BRANCO, L.G. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. *J. Thermal Biology* 26:324-330, 2001.

120. STEINER, A. A.; RUDAYA, A. Y.; IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Febrigenic signaling to the brain does not involve nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, v. 141, n. 7, p. 1204-1213, 2004.

121. TAKAHASHI, Y.; SMITH, P.; FERGUSON, A.; PITTMAN, Q. J. Circumventricular organs and fever. *Am. J. Physiol.*, v. 273, n. 5 Pt 2, p. R1690-1695, 1997.

122. TAYLOR, W. F.; BISHOP, V. S. A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart and Circulatory Physiol.*, v. 264, n. 5 Pt 2, p.H1355-H1359, 1993.

123. THOMPSON, H. M. Ocular changes in relation to dental sepsis. *Dental Cosmos*. 67:649-54, 1925.

124. TILDERS, F. J. H.; DERIJK, R. H.; VAN DAM, A. M.; VINCENT, V. A. M.; SCHOTANUS, K.; PEERSONS, J. H. A. Activation of the hypothalamus-adrenal-axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology*, v. 19, n. 2, p. 209-302, 1994.

125. TLASKALOVA- HOGENOVA, H., TUCKOVA, L., LODINOVA-ZADNIKOVA, R. Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Intern Arch of Allergy and Immunol*, v. 128, n.2, p.77-89, 2002.

126. TOBIAS, P. S.; SOLDAU, K.; ULEVITCH, R. J. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 18, p. 10867-10871, 1989.

127. 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.
128. VAN DYKE, T. E., DOWELL, V. R., 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*. 53: 671-7, 1986.
129. VAN OSS, C. J.; ABSOLOM, D. R.; MOORE, L. L.; PARK, B. H.; HUMBERT, J. R. Effect of temperature on chemotaxis, phagocytic engulfment, digestion on O₂ consumption of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Reticuloendothel. Soc.*, v. 27, n. 6, p. 561-565, 1980.
130. VAN VELZEN, S. K. T., ABRAHAM-INPIJIN, L., MOORER, W. R. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *Journal of Clinical Periodontology*. 11: 209-20, 1984.
131. VAUGHN, L. K.; VEALE, W. L.; COOPER, K. E. Antipyresis: its effect on mortality rate of bacterially infected rabbits. *Brain. Res. Bull.*, v. 5, n. 1, p. 69-73, 1980.
132. VOGEL, S. N.; KAUFMAN, E. N.; TATE, M. D.; NETA, R. Recombinant interleukin-1 alpha and recombinant tumor necrosis factor alpha synergize in vivo to induce early endotoxin tolerance and associated hematopoietic changes. *Infect. Immun.*, v. 56, n. 10, p. 2650-2657, 1988.
133. WEINSTEIN, M. P.; IANNINI, P. B.; STRATTON, C. W.; EICKHOFF, T. C. Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. *Am. J. Med.*, v. 64, p. 592-598, 1978.
134. WESCHE, H.; HENZEL, W. J.; SHILLINGLAW, W.; LI, S.; CAO, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, v. 7, n. 6, p. 837-847, 1997.
135. WEST, M.A., HEAGY, W. Endotoxin tolerance: a review. *Crit. Care Med*. 30, 64-73, 2002.
136. WILKINSON, M.F. & KASTING, N.W. Centrally acting vasopressin contributes to endotoxin tolerance. *Am. J. Physiol.* 258 (2Pt2): R443-9, 1990.
137. WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, v. 249, n. 4975, p. 1431-1433, 1990.
138. ZDARILOVÁ, A., SVOBODOVÁ, A., SIMÁNEK, V., ULRICHOVÁ, J. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-

induced alteration in human gingival fibroblasts. *Toxicol In Vitro*; 23(3):386-392, 2009.

139. ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J. Thermal Biol.*, v. 24, p. 287-326, 1999.

140. ZEISBERGER, E.; ROTH, J. Tolerance to pyrogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 856, p.116-31, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO

BRAIN RESEARCH 1152 (2007) 57–63

available at www.sciencedirect.com www.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Research Report

Reduced central c-fos expression and febrile response to repeated LPS injection into periodontal tissue of rats

Valeria P. Navarro, Maria J.A. Rocha, Luiz G.S. Branco*

Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 13 March 2007

Available online 23 March 2007

Keywords:

Fever

Endotoxin tolerance

Gingiva

Trigeminal nerve

ABSTRACT

Systemic injection of repeated doses of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) results in attenuation of the febrile response, i.e. endotoxin tolerance, which has been fairly well characterized in rats. In the present study, we tested the hypothesis that endotoxin tolerance also occurs after repeated local injection of LPS into periodontal protection tissue. Male Wistar rats were given a gingival intra-pouch injection of sterile saline or LPS at dose of 100 µg/kg on three consecutive days. Body core temperature (T_b) was measured with a miniature datalogger. Another group of animals were used for Fos immunohistochemistry 3 h after the injections in both non-tolerant and tolerant animals. On day one we observed a polyphasic febrile response after LPS injection. The increase in body temperature started about 2 h after LPS administration and lasted 5 h. On day two this response was sensitized and on day three the febrile response was completely abolished. These data suggest that rats develop endotoxin tolerance after repeated LPS administrations into tissues within the oral cavity. Moreover, immunohistochemistry detected a reduction in LPS-induced Fos-like immunoreactivity expression in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of the hypothalamus (POA) in tolerant rats compared with non-tolerant animals, indicating that the endotoxin tolerance may be locally mediated in the periodontal protection tissues of rats.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fever plays a key role in the host-defense response being part of the acute-phase reaction to systemic inflammation and infection (Kluger, 1991; Romanovsky et al., 2005). It is currently accepted that fever results from *de novo* synthesis of protein mediators (cytokines) and of mediators derived from lipid metabolism (prostaglandins) (Blatteis and Shieh, 1997). These signals from the periphery may gain access to the brain by different routes: (a) saturable transendothelial transport (Banks et al., 1989, 2002–2003); (b) via afferent fibers that travel mostly through the vagus nerve (Blatteis et al.,

2000; Romanovsky, 2000); (c) via circumventricular organs, such as the organum vasculosum of the lamina terminalis and the subfornical organ, which lack a blood–brain barrier (Blatteis et al., 2000; Takahashi et al., 1997); and (d) via interaction with cells located in the blood–brain interface, i.e. endothelial (Cao et al., 1996; Tilders et al., 1994) and perivascular cells (Elmquist et al., 1997; Saha et al., 2005). Activation of these afferent pathways ultimately increases the level of PGE₂ in the brain (Blatteis and Shieh, 1997).

However, fever and other brain mediated sickness responses can also take place in response to localized inflammation (Ross et al., 2000). These responses may occur in the

* Corresponding author. Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 3633 0999.

E-mail address: branco@forp.usp.br (L.G.S. Branco).

0006-8993/\$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainres.2007.03.045

absence of raised circulating levels of cytokines (Ross et al., 2003), when stimulation of peripheral sensory nerves transports signals of the activated immune system to the brain (Ross et al., 2003). To study this phenomenon, an experimental fever model has been employed in which lipopolysaccharide (LPS) is administered not systemically (intraperitoneal or intravenous injection of LPS, which nicely mimics systemic infection), but locally into a subcutaneous air pouch in the back of rodents that does not lead to LPS appearance in the circulation (Roth et al., 2000). Recently, this approach has been applied to the periodontium and the role of the trigeminal nerve documented (Navarro et al., 2006).

The face and oral cavity in mammals are innervated by ophthalmic, maxillary and mandibular divisions of the trigeminal nerve (Byers and Dong, 1989; Lazarov, 2001) and 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 (Fried et al., 2001). Additionally, craniofacial pain also shows some differences from those involving spinal nerves (Cechetto et al., 1985; Feil and Herbert, 1995; Sessle, 1986). Thus, we have assessed the possible differences between the roles played by inflammatory mediators following injury of peripheral and trigeminal nerve system, and we found that LPS induces fever when injected locally in the periodontal tissue by activating afferent trigeminal nerve and that the well-established mediator PGE_2 takes part in this response (Navarro et al., 2006). These results contrast with the fact that as a general rule chronic periodontitis is not accompanied by fever (Quirynen et al., 2000). To solve this apparent contradiction the present study was aimed at testing the hypothesis that LPS induces tolerance when injected locally in the periodontal tissue of rats. We also assessed c-fos expression in the subnucleus caudalis of the spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of the hypothalamus (POA) 3 h after LPS injection in non-tolerant (day 1) and tolerant (day 3) animals.

2. Results

Fig. 1 shows the development of local endotoxin tolerance in rats after three consecutive injections of LPS into the periodontium. On the first day, LPS injection ($100 \mu\text{g/kg}$) evoked a typical polyphasic febrile response [$F(1,24)=5.20$, $P=0.04$] compared with saline-treated controls. The increase in T_b started about 2 h after LPS administration with the first peak occurring at 150 min postinjection, and the second peak at 240 min after LPS treatment. On the second day, rats treated with LPS into the periodontium presented an alteration of the polyphasic response to a monophasic response [$F(1,24)=18.53$, $P<0.001$]. However, the increase in T_b was earlier and started about 50 min after LPS administration. After the third day of LPS injection into the periodontium, the fever response was completely abolished. This response did not differ from the saline-injected group [$F(1,24)=0.34$, $P=0.56$].

Expression of immunoreactive Fos protein was assessed in non-tolerant (day one) and tolerant (day three) rats 3 h after LPS ($100 \mu\text{g/kg}$) administration into the periodontium. Fos-positive neurons were found bilaterally in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area

Fig. 1 – Body core temperature responses to repeated saline or LPS ($100 \mu\text{g/kg}$) (arrow) injections into the periodontal protection tissue of rats on the first (A), second (B) and third (C) day of injections. The number of animals per group is shown in parentheses. The values are means $\pm$ SEM ($^*p<0.05$ compared with saline-treated group).

of hypothalamus in both groups (Fig. 2), but with different mean counts. In non-tolerant animals (day 1) there was an increased number of Fos-labeled neurons in both areas compared with the tolerant animals (day 3). In the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus of the tolerant animals, the number of Fos-positive neurons was significantly lower than that observed in the non-tolerant animals [$F(1,16)=17.37$, $P<0.001$] (Fig. 3A). In the POA, the number of Fos-positive neurons was also significantly lower in tolerant than in non-tolerant animals [$F(1,14)=35.94$, $P<0.001$] (Fig. 3B). In all the control groups (treated with saline), the number of Fos-positive neurons was significantly lower than that observed

Fig. 2 – Photomicrographs of subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus (A) and preoptic area of hypothalamus (B) (10× magnification) showing Fos-IR neurons after saline (1) or LPS (100 µg/kg) injected into periodontium in the first day (3) and in the third consecutive day (4) after injections. The negative control group (2) did not show any labeled neuron. The coronal schematics in the right panels show the localization of the areas in light gray. ac, anterior commissure; LV, lateral ventricle; ox, optic chiasm; POA, preoptic area; 3V, third ventricle; Sp5, spinal trigeminal tract; Sp5C, caudal part of spinal trigeminal nucleus; py, pyramidal tract.

in the LPS-treated groups ($P < 0.05$) of both non-tolerant and tolerant animals (Figs. 2 and 3). The negative controls did not show any labeled neurons (Fig. 2).

3. Discussion

In the present study, we have locally injected three repeated doses of LPS into the periodontal protection tissues of rats at 24-h intervals to verify the possible induction of LPS tolerance and the possible attenuation of c-fos expression in the subnucleus caudalis of the spinal trigeminal nucleus and in the POA of hypothalamus in non-tolerant rats (day 1)

compared with tolerant (day 3) animals. Our results indicate that repeated local LPS injections developed tolerance on the third day of LPS treatment and this tolerance was expressed through an attenuation of the febrile response. Our results add to previous studies that assessed tolerance to LPS, documenting that it may also occur locally (at least in the oral cavity) besides systemically. In addition, by investigating the expression of c-fos, our data show for the first time an attenuation of neuronal activation in the subnucleus caudalis, where the trigeminal nerve makes its first synapse, and in neurons of the POA known to be the thermointegrative site of the central nervous system (Blatteis and Sehic, 1997; Blatteis et al., 2000; Kluger, 1991; Nagashima et al., 2000; Steiner et al., 2002) in

Fig. 3 – Effect of periodontium LPS injection (100 μ g/kg) on c-fos expression in the first day (non-tolerant rats) and in the third consecutive day (tolerant rats) after injections. The control animals were treated with sterile saline. The number of animals per group is shown in parentheses. Bars represent the average $\pm$ SEM 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). The negative control group did not show any labeled neuron.

response to repeated local injection of LPS in the periodontium, confirming the development of local endotoxin tolerance. These results can be taken as an indication that the endotoxin tolerance may be locally mediated in the periodontal protection tissues of rats. Alternatively, central inhibitory mechanism(s) might have occurred, not related to the signal generated in the mouth, to a decreased neuronal activity and consequently c-fos activation. Further studies are needed to address this issue. One way or the other, it is crucial to mention that we have recently provided strong evidence that LPS injection into the gingiva does not lead to systemic-mediated fever, but rather a locally mediated phenomenon. According to this notion, fever after intra-gingival LPS injection is completely prevented by cutting the trigeminal nerve (Navarro et al., 2006).

Systemic LPS-induced tolerance has been described mainly by means of an alteration of the polyphasic response to monophasic in rats (Almeida et al., 1999; Soszynski et al., 1991; Wilkinson and Kasting, 1990), while in mice it has been expressed through an attenuation of the febrile response (Dias et al., 2005). In the present study, tolerance to LPS injected in periodontal protection tissues of rats was characterized on the

second day of treatment, by a modification of the pattern of febrile response, and on the third day, by a complete abolition of the febrile response (Fig. 1). The different routes of administration of LPS may be one reason to explain these differences. Additionally, Rudaya et al. (2005) recently measured the thermoregulatory responses to LPS in the mouse and interestingly concluded that in thermoregulation research caution should be taken to administer LPS in a stress-free fashion and to run experiments at a controlled ambient temperature, to assess the intricate response to LPS.

Recently, there has been an increased interest in the mechanisms responsible for altered responsiveness to bacterial endotoxin because the ability of the animals to become tolerant to LPS is crucial to achieve a controlled inflammatory response and warrant survival of the organism (Lindberg et al., 1983). Tolerance has been extensively studied using i.p. or i.v. repeated administrations of LPS at short-term intervals (cf. Beeson, 1947). Development of tolerance to LPS appears to be an important mechanism to produce controlled inflammatory responses and is an important mechanism on sepsis (Freudenberger et al., 1998; Ivanov et al., 2000). Tolerant animals exhibit less pronounced responses to nonlethal doses of LPS and also survive to LPS doses that would typically be lethal (Freudenberger et al., 1998; Ivanov et al., 2000). The induction of tolerance represents a highly effective prophylactic mechanism against mortality from endotoxin shock (Freudenberger et al., 1998). However, the investigation of local LPS tolerance in the oral cavity had not been assessed in vivo. Oral endotoxin tolerance has been studied in vitro, with culture of monocytes and macrophages (Shnyra et al., 1998; Muthukuru et al., 2005). Human monocytic cells pretreated with low-dose LPS have an altered LPS-stimulated cytokine production (Seatter et al., 1995; West and Heagy, 2002), in particular a reduction in TNF (Seatter et al., 1995). Moreover, the oral mucosal tolerance has been related with the inhibition of the response to antigens and is associated with down-regulation of cell surface expression of the Toll-like receptors, CD14 and others (Taskalova-Hogenova et al., 2002). Taskalova-Hogenova et al. (2002) considered that, in experimental gnotobiotic models, highly protective colonization of mucosal surfaces of commensals has an important stimulatory effect on postnatal development of immune responses, metabolic processes (e.g. nutrition) and other host activities; these local and systemic immune responses are latter replaced by inhibition, i.e. by induction of mucosal (oral) tolerance. One can speculate that these mechanisms may also be present in our model.

At this point, it is clear that endotoxin tolerance is an adaptive response. In human chronic periodontitis, the destruction of tooth-supporting structures can be done by bacteria or by its products, such as LPS (Jotwani et al., 2001). We measured an attenuation of neuronal activation, in both subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of hypothalamus after repeated administration of LPS in the periodontal tissues further confirming the occurrence of tolerance induced by LPS in the periodontal protection tissues. In relation to microbiota, gram-negative bacteria predominate in moderate to severe periodontal lesions (Kamma et al., 1994).

The c-fos expression technique has been extensively used as a marker of neuronal activity, induced by a number of

stimuli including nociceptive stimuli in the oral cavity caused by tooth movement (Magdalena et al., 2004), LPS-induced pulpar inflammation (Chattipakorn et al., 2002) and by single injection of LPS into the periodontium (Navarro et al., 2006). Several studies have shown that the caudal part of the spinal trigeminal nucleus is an important site that relays nociceptive input from orofacial structures (Sessle, 1986) including the dentition (Byers et al., 2000).

In conclusion, the present data indicate that rats develop endotoxin tolerance after repeated LPS administrations in the oral cavity, and we speculate that the endotoxin tolerance may be locally mediated in the periodontal protection tissues of rats since immunohistochemistry detected a reduction in LPS-induced *c-fos* expression in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of the hypothalamus in tolerant rats compared with non-tolerant animals.

We thus provide *in vivo* evidence for the first time that LPS tolerance can be achieved by intra-gingival injection which remained unexplored so far. There exist very few information in the literature about the mechanisms of tolerance in the oral cavity, despite of the fact that the periodontal tissues are constantly been infected with pathogens and their products like LPS, so the mucosal tolerance may be present to maintain the balance in such infected tissues. Furthermore, the mechanism of tolerance could explain the fact that as a general rule chronic periodontitis is not accompanied by fever.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

The experiments were performed on male Wistar rats weighing 250–300 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 a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 6:00 A.M.). The animals had free access to water and food. The experiments were performed between 8:00 A.M. and 4:00 P.M. 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 (No. 06.1.142.53.8).

4.2. Surgery

All surgical procedures were performed in rats 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 20 mg/kg, *i.m.*, ketamine and 2 mg/kg, *i.m.*, xylazine and protected with antibiotic [benzylpenicillin 160,000 IU/kg, streptomycin 33.3 mg/kg, and dihydrostreptomycin 33.3 mg/kg, intramuscular (*i.m.*)]. Banamine Pet (analgesic) was also used in the day of the surgery (Schering-Plough-Rio de Janeiro-RJ-Brazil) at a dose of 5 mg/kg. 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, USA) 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 Tb measurements, a miniature data-logger (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada) was implanted through a medial laparotomy. The experiments were performed 3 days after the surgery.

4.3. Body temperature measurements

For all protocols, Tb was measured by the data logger (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada) at 5-min intervals and plotted at 15-min intervals, during a period of 1 h before and 6 h after the treatments. Data were acquired and fed to a computer by using The SubCue Program Software (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada). Data were corrected with the correction formula using the calibration data to the imported temperature data. The calibration data are specific for each individual data logger.

4.3.1. Drugs

LPS derived from *Escherichia coli* (O111:B4 Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in sterile 0.9% sodium chloride (saline). LPS was injected locally at a dose of 100 μ g/kg in three consecutive days.

4.4. 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 20 mg/kg, *i.m.*, ketamine and 2 mg/kg, *i.m.*, xylazine. To confirm anesthesia depth, the withdrawal reflex to tail pinch was assessed. 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 in to 40- μ m coronal sections, which were collected in a cryoprotectant solution (0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, 30% ethyleneglycol, and 20% glycerol) and stored at -20 °C.

4.5. Fos immunohistochemistry

Every third section was processed for Fos immunohistochemistry. The 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 (Vector, Burlingame, CA, USA) for 45 min and then incubated for 24 h at 4 °C with polyclonal anti-*c-fos* serum generated in rabbits (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). 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). They were subsequently washed in PBS and placed for 30 min in avidin-biotin peroxidase complex (ABC kit, Vectastain, Vector, Burlingame, CA, USA). The 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. The sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated through an ascending ethanol series, cleared with xylene and coverslipped with Entellan. As the antibody used in this study recognizes c-fos and Fos-related proteins, the immunoreactive neurons are described as Fos-like immunoreactive (Fos-IR).

4.6. Fos immunohistochemistry analysis

The sections were analyzed by light microscopy and the labeled neurons were detected with the $\times 10$ objective of a Zeiss KS30 microscope. For a cell to be considered to express Fos-like immunoreactivity, the nucleus of the neurons had to be of appropriate size (cell nucleus diameter ranging approximately from 8 to 15 μm) and shape (oval or round) and be distinct from background at $\times 10$ magnification. For quantification, all brain sections of each nucleus (subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and preoptic area of hypothalamus) were counted bilaterally for each rat. The sections were selected based on the atlas of Paxinos and Watson (1998) and were counted without previous knowledge of the experimental treatment. Adobe Photoshop (San Jose, CA, USA) was used to enhance the contrast of the images.

4.7. Experimental protocols

Periodontal injection procedure. All injections into the periodontium were made with the use of a 10 μl Hamilton syringe. LPS was injected at a volume of 10 $\mu\text{l/kg}$ ($\sim 3 \mu\text{l/animal}$); LPS solutions of 10 mg/ml were used to achieve final dose of 100 $\mu\text{g/kg}$. Before the injection of each drug, a volume of 3 μl of air was injected through the catheter to delineate a pouch and after the injections the catheter was closed with a stainless metal.

4.7.1. Protocol 1

Local LPS-induced tolerance in the oral tissues of rats. Tolerance to LPS was induced by three repeated injections of LPS (100 $\mu\text{g/kg}$) via the gingival catheter, into the periodontal protection tissue of rats at 24-h intervals. Control rats were injected in the periodontium with pyrogen-free sterile saline (vehicle) instead of LPS. Tb was measured during a period of 6 h after injections.

4.7.2. Protocol 2

Verification and quantification of the expression of immunoreactive Fos protein in the caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of hypothalamus after LPS administration on the periodontium in non-tolerant (day one) and in tolerant (day three) rats. To verify the expression of c-fos in the caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of hypothalamus,

a separate group of animals were used in c-fos immunohistochemical studies. A dose of 100 $\mu\text{g/kg}$ LPS or saline was administered (via catheter) into the periodontium of rats in three consecutive days and 3 h after injection animals were perfused, a group on day one and another group on day three. The brain sections were processed for immunohistochemistry and the immunoreactive neurons were quantified.

4.8. Statistical analysis

All values are reported as means $\pm$ SEM. The thermal response to administration of LPS or vehicles 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. The statistical analysis was calculated by the computer program Sigma Stat 3.1. The values were considered significantly different when $p < 0.05$. The number of Fos-IR neurons was compared by one-way analysis of variance for repeated measures, followed by Duncan's post hoc test, with $p < 0.05$ indicating a significant difference.

Acknowledgments

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 Anastácio and Gustavo Michel Batista de Souza are recipients of FAPESP technician scholarships. Valeria P. Navarro is a recipient of a FAPESP graduate scholarship.

REFERENCES

- Almeida, M.C., Trevisan, F.N., Barros, R.C., Camio, E.C., Branco, L.G., 1999. Tolerance to lipopolysaccharide is related to the nitric oxide pathway. *NeuroReport* 10, 3061–3065.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Durham, D.A., 1989. Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res. Bull.* 23, 433–437.
- Banks, W.A., Farr, S.A., Morley, J.E., 2002–2003. Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation* 10, 319–327.
- Beeson, P.B., 1947. Tolerance to bacterial pyrogens. Factors influencing in development. *J. Exp. Med.* 86, 29–38.
- Blatteis, C.M., Sehic, E., 1997. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain. *News Physiol. Sci.* 12, 1–9.
- Blatteis, C.M., Sehic, E., Li, S., 2000. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. *Clin. Infect. Dis.* 31, S168–S177.
- Byers, M.R., Dong, W.K., 1989. 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, 117–127.
- Byers, M.R., Chudler, E.H., Iadarola, M.J., 2000. Chronic tooth pulp inflammation causes transient and persistent expression of Fos in dynorphin-rich regions of rat brainstem. *Brain Res.* 861, 191–207.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K., Watanabe, Y., 1996. 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, 263–272.
- Cechetto, D.F., Standaert, D.G., Saper, C.B., 1985. Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 240, 153–160.
- Chattipakorn, S.C., Sigurdsson, A., Light, A.R., Narhi, M., Mabner, W., 2002. Trigeminal c-fos expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. *Pain* 99, 61–69.
- Dias, M.B., Almeida, M.C., Carnio, E.C., Branco, L.G., 2005. Role of nitric oxide in tolerance to lipopolysaccharide in mice. *J. Appl. Physiol.* 98, 1322–1327.
- Elmqvist, J.K., Breder, C.D., Sherin, J.E., Scammell, T.E., Hickey, W.F., Dewitt, D., Saper, C.B., 1997. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J. Comp. Neurol.* 381, 119–129.
- Feil, K., Herbert, H., 1995. Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.* 353, 506–528.
- Freudenberger, M.A., Saldaña, R., Sing, A., Mitov, I., Galanos, C., 1998. Reconciling the concepts of endotoxin sensitization and tolerance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 397, 261–268.
- Fried, K., Bongenhielm, U., Boissonade, F.M., Robinson, P.P., 2001. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. *Neuroscientist* 7, 155–165.
- Ivanov, A.I., Kulchitsky, V.A., Sugimoto, N., Simons, T., Romanovsky, A.A., 2000. Does the formation of lipopolysaccharide tolerance require intact vagal innervation of the liver? *Auton. Neurosci.* 85 (1–3), 111–118.
- Jotwani, R., Pallicka, A.K., Al-Quotub, M., Nouri-Shirazi, M., Kin, J., Bell, D., 2001. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J. Immunol.* 167, 4693–4700.
- Kamma, J.J., Nakou, M., Manti, F.A., 1994. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J. Periodontol.* 65, 1073–1078.
- Kluger, M.J., 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 71, 93–127.
- Lazarov, N.E., 2001. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog. Neurobiol.* 66, 19–59.
- Lindberg, A.A., Greisman, S.E., Svenson, S.B., 1983. Induction of endotoxin tolerance with nonpyrogenic O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 41 (3), 888–895.
- Magdalena, C.M., Navarro, V.P., Park, D.M., Stuan, M.B.S., Rocha, M.J.A., 2004. c-fos expression in the rat brain nuclei following incisor tooth movement. *J. Dent. Res.* 83, 50–54.
- Muthukuru, M., Jotwani, R., Cutler, C.W., 2005. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infect. Immun.* 73 (2), 687–694.
- Nagashima, K., Nakai, S., Tanaka, M., Kanosue, K., 2000. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton. Neurosci.* 85, 18–25.
- Navarro, V.P., Iyemasa, M.M., Leite-Panissi, C.R.A., Almeida, M.C., Branco, L.G.S., 2006. New role of the trigeminal nerve as a neuronal pathway signaling brain in acute periodontitis: participation of local prostaglandins. *Flugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 453, 73–82.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic.
- Quirynen, M., Mongardini, C., Soete, M., Pauwels, M., Coucke, W., Eldere, J.V., Steenberghe, D.V., 2000. The role of chlorhexidine in the one-stage full-mouth disinfection treatment of patients with advanced adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 27, 578–589.
- Romanovsky, A.A., 2000. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. *Auton. Neurosci.* 85, 39–48.
- Romanovsky, A.A., Almeida, M.C., Aronoff, D.M., Ivanov, A.I., Konsman, J.P., Steiner, A.A., Turek, V.F., 2005. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front. Biosci.* 10, 2193–2216.
- Ross, G., Roth, J., Stör, B., Voigt, K., Zeisberger, E., 2000. Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chamber in guinea pigs. *Physiol. Behav.* 71, 305–313.
- Ross, G., Hubschle, T., Pehl, U., Braun, H.A., Voigt, K., Gerstberger, R., Roth, J., 2003. Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J. Appl. Physiol.* 94, 1395–1402.
- Roth, J., Stör, B., Martin, D., Voigt, K., Zeisberger, E., 2000. 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.
- Rudaya, A.Y., Steiner, A.A., Jared, R.R., Dragic, A.S., Romanovsky, A.A., 2005. Thermoregulatory response to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on dose and ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, 1244–1252.
- Saha, S., Engstrom, L., Mackerkova, L., Jakobsson, P.J., Blomqvist, A., 2005. Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin G synthase-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Physiol.* 288 (5), R1100–R1107.
- Seatter, S.C., Li, M.H., Bubrick, M.P., 1995. Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators. *Shock* 3, 252–258.
- Sessle, B.J., 1986. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J. Endod.* 12, 435–444.
- Shnyra, A., Brewington, R., Alipio, A., Amura, C., Morrison, D.C., 1998. Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL-10 and IL-12. *J. Immunol.* 160, 3729–3736.
- Soszynski, D., Kozak, W., Szewczenko, M., 1991. Course of fever response to repeated administration of sublethal doses of lipopolysaccharides, polyinosinic-polycytidylic acid and muramyl dipeptide to rabbits. *Experientia* 47, 43–47.
- Steiner, A.A., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L.G., 2002. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Res.* 944 (1–2), 135–145.
- Takahashi, Y., Smith, P., Ferguson, A., Pittman, Q.J., 1997. Circumventricular organs and fever. *Am. J. Physiol.* 273, R1690–R1695.
- Tilders, F.J., Derijk, R.H., Vandam, A.M., Vincent, V.A., Schotanus, K., Persoons, J.H., 1994. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 19, 209–232.
- Taskalova-Hogenova, H., Tuckova, I., Lodinova-Zadnikova, R., 2002. Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Allergy Immunol.* 128, 77–89.
- West, M.A., Heagy, W., 2002. Endotoxin tolerance: a review. *Crit. Care Med.* 30, 64–73.
- Wilkinson, M.F., Kasting, N.W., 1990. Centrally acting vasopressin contributes to endotoxin tolerance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 258, 443–449.

ANEXO 2 – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA**Central nitric oxide inhibition reverts reduction in periodontal LPS-induced fos expression in endotoxin tolerant rats****Valeria P. Navarro, Luiz G. S. Branco**

Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Running head: Preoptic area, *c-fos*, endotoxin.

Corresponding author: Valeria P. Navarro: Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Phone: 55 16 3602-4051 Fax: 55 16 3633-0999. E-mail: valeriapontelli@forp.usp.br

ABSTRACT

Endotoxin tolerance is an attenuation of the febrile response to repeated administrations of lipopolysaccharide (LPS). We have recently shown that LPS tolerance happens into periodontal tissue of rats. In this study, we tested the hypothesis that central nitric oxide (NO) modulates periodontal LPS-induced fos expression in the caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of hypothalamus (POA) in tolerant rats. Rats received a gingival injection of LPS (100 µg/kg) on 3 consecutive days. Another group received *N*^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) 500µg/rat intracerebroventricular, before LPS, in the third day. Body temperature (Tb) was measured with dataloggers and Fos immunohistochemistry was performed. On day 1 a polyphasic febrile response after LPS was observed, on day two this response was desensitized and on day three the febrile response was completely abolished, characterizing the development of endotoxin tolerance. This tolerance was reverted with the pretreatment with L-NMMA. Immunohistochemistry detected an increased fos expression in the caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus and in the preoptic area of hypothalamus (POA) on day 1, that was blunted on day 3. Similarly to the reverted febrile response on day 3 pretreatment with L-NMMA augmented the number of fos positive cells in both CNS areas. The present data are consistent with the notion that besides the peripheral input the ongoing activity of neurons in both the spinal trigeminal nucleus and the POA can be driven by central nitric oxide, and consequently a modulation of the endotoxin tolerance is observed.

KEY WORDS: Central nervous system; Trigeminal system; Lipopolysaccharide; Immunohistochemistry, Inflammation.

1. INTRODUCTION

Fever is a complex physiological reaction resulting from contact with infection or inflammatory agents referred to as exogenous pyrogens. It is, thus, a part of an array of systemic reactions that are collectively called the “acute-phase response” (Blatteis and Sehic 1997; Kluger 1991). A component of the outer membrane of gram-negative bacteria, called endotoxin (LPS) is most frequently used in a febrile response model. In response to LPS, a wide variety of cytokines are mobilized to induce, by means of either humoral or neuronal pathways, the synthesis and release of prostaglandins, especially prostaglandin E₂ (PGE₂), which acts in the POA, affecting thermoregulatory neurons and resulting in a regulated elevation in Tb, defined as fever (Blatteis et al. 2000; Kluger 1991). The oral cavity harbors more than 500 distinct bacterial species (Paster et al. 2001; Daniluk et al. 2006) and in periodontal diseases gram-negative bacteria predominates, with large amounts of LPS in their outer membrane.

Repeated administration of LPS at short-term intervals results in attenuation of the febrile response, which is called endotoxin tolerance (Beeson 1947; West and Heagy 2002). This mechanism has been largely explored systemically and appears to be important to produce controlled inflammatory response and represents a highly effective prophylactic mechanism against mortality from endotoxin shock (Freudenberg et al. 1998; Ivanov et al. 2000).

Tolerance has been reported as an adapted immune response, rather than a state of a simple hyporesponsiveness. Modulation of LPS-binding sites (toll-like receptor 4) and an altered intracellular signaling have been suggested (Piao et al. 2007).

Moreover, tolerance has been suggested to be modulated by a number of mediators and modulators including nitric oxide (NO) (Almeida et al. 1999; Dias et al. 2005). NO is synthesized from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS), resulting in the formation of L-citrulline and NO (Griffith and Stuehr 1995; Palmer et al. 1988). This diffusible gaseous neurotransmitter has been demonstrated to be an important signaling molecule in thermoregulation, fever and in endotoxin tolerance. (Almeida et al. 1999; Dias et al. 2005; Steiner and Branco 2002; Steiner and Branco 2001).

It has been suggested that upon stimulation by LPS, inducible nitric oxide synthase (iNOS) becomes expressed, leading to the production of large amounts of NO in periphery tissues as well in the brain (Moncada et al. 1991). However, the role of central NO modulating oral endotoxin tolerance remains unknown. Thus, the aim of the present study was to test the hypothesis that central NO pathway modulates neuronal activity of key CNS regions, *i.e.*, caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus and the POA, for the development of the LPS-induced tolerance in the oral cavity of rats. Therefore we assessed *c-fos* expression in these regions three hours after LPS injection in the periodontal tissues in non-tolerant (day 1) and in tolerant (day 3) rats pre-treated with saline or L-NMMA i.c.v, a nonselective NO synthase inhibitor.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Animals The experiments were performed on male Wistar rats weighing 250–300 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 a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 6:00 A.M.). The animals had free access to water and food. The experiments were performed between 8:00 A.M. and 4:00 P.M. 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 06.1.142.53.8).

2.2. Surgery All surgical procedures were performed in rats 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 20 mg/kg, ketamine and 2 mg/kg, xylazine and protected with antibiotic [benzylpenicillin 160,000 IU/kg, streptomycin 33.3 mg/kg, and dihydrostreptomycin 33.3 mg/kg, intramuscular (i.m.)]. A pain killer Banamine Pet was also used in the day of the surgery (Schering-Plough – Rio de Janeiro – RJ) at a dose of 5 mg/kg. Before all surgical procedures the material used was sterilized. 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, USA) 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 and the experiments were performed 3 days after the surgery. In animals designated for experiments involving Tb measurements, a miniature datalogger (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada) was implanted through a medial laparotomy. The experiments were performed 3 days after the surgery. Animals designated for experiments involving intracerebroventricular (i.c.v) injections were fixed in a stereotaxic frame, and had a stainless steel guide cannula (0.7mmOD) introduced into the right lateral cerebral ventricle (stereotaxic coordinates with Bregma landmark: anterior – 1.0 mm, lateral – 1.6 mm from midline, dorsal 3.2 to 3.7 mm from the skull surface; incisive bar at – 3.3 mm) (Paxinos and Watson 1998). The displacement of the meniscus in a water manometer ensured correct positioning of the cannula in the lateral ventricle. The cannula was attached to the bone with stainless steel screws and acrylic cement. A tight fitting stylet was kept inside the guide cannula to prevent occlusion and the experiments were performed 7 days after the surgery.

2.3. Body temperature measurements For all protocols, Tb was measured by the datalogger (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada) at 5-min intervals and plotted at 15-min intervals, during a period of 1 h before and 6 h after the treatments. Before the insertion of the datalogger in the animal, it was calibrated using the SubCue Program Software and after removed the data were acquired and fed to a computer by using the same program (SubCue Dataloggers B10280336 Calgary, AB, Canada). Data were corrected with the correction formula using the calibration data to the imported temperature data. The calibration data is specific for each individual datalogger. The datalogger could be sterilized, calibrated and re-used in another animal. Eventually, temperature data obtained using the loggers were checked using a mercury thermometer.

2.4. Drugs LPS derived from *Escherichia coli* (O111:B4 Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in sterile 0.9% sodium chloride (saline). LPS was injected locally at a dose of 100 μ g/kg in three consecutive days. *N*^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (7*A/46749 Tocris, Ellisville, MO, USA) was dissolved in saline and injected i.c.v. at a dose of 500 μ g/rat).

2.5. 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 20 mg/kg, i.m., ketamine and 2 mg/kg, i.m., xylazine. To confirm anesthesia depth, the withdrawal reflex to tail pinch was assessed. 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-µm coronal sections, which were collected in a cryoprotectant solution (0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, 30% ethyleneglicol, and 20% glycerol) and stored at –20°C.

2.6. Fos immunohistochemistry Every third section was processed for fos immunohistochemistry. The 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 (Vector, Burlingame, CA, USA) for 45 min and then incubated for 24 h at 4°C with polyclonal anti-*c-fos* serum generated in rabbits (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The serum was diluted (1:1,000) 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). They were subsequently washed in PBS and placed for 30 min in avidin–biotin peroxidase complex (ABC kit, Vectastain, Vector, Burlingame, CA, USA). The 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. The sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated through an ascending ethanol series, cleared with xylene, and coverslipped with Entellan. As the antibody used in this study recognizes *c-fos* and fos-related proteins, the immunoreactive neurons are described as fos-like immunoreactive (Fos-IR).

2.7. Fos immunohistochemistry analysis The sections were analyzed by light microscopy and the labeled neurons were detected with the ×10 objective of a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with a camera lucida. For a cell to be considered to express fos-like immunoreactivity, the nucleus of the neurons had to be of appropriate size (cell nucleus diameter ranging approximately from 8 to 15 µm) and shape (oval or round) and be distinct from background at ×10 magnification. For quantification, all brain sections of each nucleus (subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and preoptic area of hypothalamus) were counted unilaterally for each rat. The sections were selected based on the atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1998) and were counted without previous knowledge of the experimental treatment.

2.8. Experimental protocols

Periodontal injection procedure: All injections into the periodontium were made with the use of a 10 Hamilton syringe. LPS was injected at a volume of 10 µl/kg (~3 µl/animal); LPS solutions of 10 mg/ml were used to achieve final dose of 100 µg/kg. Before the injection of each drug, a volume of 3 µl of air was injected through the

catheter to delineate a pouch and after the injections the catheter was closed with a stainless metal.

2.8.1. Protocol 1 – Verification of the participation of nitric oxide in LPS-induced tolerance in the oral tissues of rats.

Tolerance to LPS was induced by three repeated injections of LPS (100 µg/kg) via the gingival catheter, into the periodontal protection tissue of rats at 24-h intervals. Control rats were injected in the periodontium with pyrogen-free sterile saline (vehicle) instead of LPS. In the third day, 30 min before LPS or saline, animals were pre-treated with L-NMMA or saline i.c.v. (500 µg/rat). Tb was measured during a period of 6 h after injections.

2.8.2. Protocol 2 - Verification and quantification of the expression of immunoreactive fos protein in the caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus and in the POA after LPS administration on the periodontium in non- tolerant (day 1) and in tolerant (day 3) rats pre-treated with L-NMMA or saline i.c.v.

To verify the expression of *c-fos* in the caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus and in the POA, a dose of 100 µg/kg LPS or saline were administered (via catheter) into the periodontium of rats in three consecutive days and 3 h after injection animals were perfused, a group on day one and two groups on day three (one pretreated with saline i.c.v. and the other with L-NMMA i.c.v.). The brain sections were processed for immunohistochemistry and the immunoreactive neurons were quantified.

2.9. Statistical analysis All values are reported as means±SEM. The thermal response to administration of LPS or vehicles 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. The values were considered significantly different when $p < 0.05$. The number of Fos-IR neurons was compared by one-way analysis of variance, followed by Duncan's post hoc test, with $p < 0.05$ indicating a significant difference.

3. RESULTS

Figure 1 shows the effect of pretreatment with L-NMMA given i.c.v. in the LPS-induced tolerance in the oral tissues of rats. On the first day, LPS injection (100 µg/kg) evoked a typical polyphasic febrile response [$F(28,587) = 5.66$, $P < 0.001$] compared with saline-treated controls. On the second day, rats treated with LPS into the periodontium presented an alteration of the polyphasic response to a monophasic response [$F(28,587) = 3.41$, $P < 0.001$]. On the third day of LPS injection into the periodontium, in rats pretreated with L-NMMA a febrile response could be observed, which was similar to the first day of injection, whereas in rats pretreated with saline also given intracerebroventricularly tolerance persisted [$F(31,357) = 4.20$, $P < 0.001$]. Control animals pretreated with saline into the periodontium and L-NMMA or saline given intracerebroventricularly had no effect on body temperature. These results showed the participation of nitric oxide in LPS-induced tolerance in the oral tissues of rats.

Expression of immunoreactive fos protein was assessed in 3 groups of animals: non-tolerant rats (day 1), saline-treated tolerant rats (day 3) and L-NMMA-treated tolerant rats (day 3). All groups were perfused 3 h after LPS (100 µg/kg) administration into the periodontium. Figure 2 shows the expression of fos protein in subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and Figure 3 in the POA. On day 1, fos-positive neurons could be easily observed bilaterally in the subnucleus caudalis of spinal

trigeminal nucleus and in the POA in LPS-treated animals (Fig. 2 B1 and Fig. 3 B1), compared with saline-treated animals (Fig. 2 A1 and Fig. 3 A1) ($p < 0.05$). In tolerant animals pre-treated with saline i.c.v. and LPS into the periodontium (day 3), a decreased number of fos-labelled neurons in both areas was observed (Fig. 2 B2 and Fig. 3 B2) compared with non-tolerant animals (day 1) (Fig. 2 B1 and Fig. 3 B1) ($p < 0.05$). In rats pretreated with L-NMMA i.c.v. and LPS into the periodontium (day 3) (Fig. 2 B3 and Fig. 3 B3) the number of fos-positive neurons was significantly increased in relation to the one observed in the saline-treated i.c.v. animals and LPS into the periodontium (day 3) (Fig. 2 B2 and Fig. 3 B2), in both the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the POA ($p < 0.05$). In all the control groups (treated with saline into the periodontium), the number of fos-positive neurons were significantly lower than that observed in the LPS-treated groups ($p < 0.05$) (Figs. 2 and 3). The negative controls did not show any labelled neurons.

Figure 4 shows the quantification of fos-positive neurons in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus (Fig. 4 A) and in the POA (Fig. 4 B) summarizing the results described above.

4. DISCUSSION

By investigating the expression of *c-fos*, an enhanced neuronal activation was observed both in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus, where the trigeminal nerve makes its first synapse, and in neurons of the POA known to be the thermointegrative site of the central nervous system (Almeida et al. 2006; Blatteis and Sehic 1997; Blatteis et al. 2000; Steiner et al. 2002) in response to the peripheral input, *i.e.*, the gingival injection of LPS. Moreover, central injection of L-NMMA before local LPS injection in the periodontium in the third day reverted the decreased neuronal activity observed in parallel with the endotoxin tolerance. These results can be taken as an indication that central NO participates in the LPS-induced tolerance in periodontal tissues of rats, by modulating temperature regulation integration and outflow, despite of the kept input. Furthermore the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and the POA, key sites for the body temperature regulation after gingival LPS injection, constitutes an important center mediating NO actions on thermoregulation.

Besides, one can also speculate that central NO production may be increased along with the development of LPS tolerance in the oral cavity, which would account for the reduced febrile response. Supporting this hypothesis, i.c.v administration of the NOS inhibitor L-NMMA abolished the endotoxin tolerance in the third day of LPS administration.

Systemically LPS-induced tolerance is now well characterized and it is described mainly by means of an alteration of the biphasic response to monophasic in rats (Almeida et al. 1999; Soszynski et al. 1991; Wilkinson 1990), while in mice, it has been expressed through an attenuation of the febrile response (Dias et al. 2005). In a recent study, tolerance to LPS injected in periodontal protection tissues of rats was characterized on the second day of treatment, by a modification of the pattern of febrile response, and on the third day, by a complete abolition of the febrile response (Navarro et al. 2007).

Investigation of LPS tolerance and the mechanisms responsible for the altered responsiveness to bacterial endotoxin have been of considerable interest since the ability of the animals to become tolerant to LPS is crucial to the survival of the organism by eliciting controlled inflammatory responses (Lindberg 1983). Development of tolerance to LPS also appears to be an important mechanism during sepsis (Freudenberg et al. 1998; Ivanov et al. 2000). Tolerance has been extensively studied using i.p. or i.v.

repeated administrations of LPS at short-term intervals (*cf.* Beeson 1947; Beishuizen et al. 2003; Franklin et al. 2007). More recently, we have provided evidence that LPS injection into the gingiva in three consecutive days results in local LPS tolerance in the oral cavity (Navarro et al. 2007). In the present study we further examined this phenomenon by means of documenting the participation of NO in this mechanism, and inferring into its mechanism. Reconciling the existing data one can speculate that the mechanism of local (mouth) tolerance may be eventually mediated by the same brain regions (mainly POA) after the signal being processed by the trigeminal nerve and the caudal part of the spinal trigeminal nucleus. These findings add a new role for NO mediating the oral cavity endotoxin tolerance, which is in agreement with previous data indicating that NO has indeed an important role on the thermoregulation, fever and even mediating the systemically induced LPS tolerance (Steiner and Branco 2001). In the central nervous system, NO has been shown to decrease body temperature acting as an antipyretic molecule (Steiner et al. 2002; Steiner and Branco 2001). On the other hand, systemic administration of NO inhibitors causes hypothermia and inhibits LPS fever (Scammell et al. 1996). The peripheral effect of NO during fever seems to be related to its direct effect on thermoregulatory tissues rather than the febrigenic signaling to the brain (Steiner et al. 2004). In agreement, NO has been reported to alter thermoregulation by acting directly either in the brown adipose tissue, where it is needed for heat production (Monda et al. 1995; Nagashima et al. 1994) or in vascular smooth muscle (Taylor and Bishop 1993) where it can alter heat loss and conservation through the skin.

To study neuronal activation in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in POA, we used the *c-fos* expression technique, which has been extensively used as a marker of neuronal activity, induced by a number of stimuli including nociceptive stimuli in the oral cavity caused by tooth movement (Magdalena et al. 2004), LPS-induced pulpar inflammation (Chattipakorn et al. 2002) and by injection of LPS into the periodontium (Navarro et al. 2006; Navarro et al. 2007). The rationale to assess these two brain regions is because the somatosensory innervation of the oral cavity in mammals is provided by the trigeminal nerve (Byers and Dong 1989; Lazarov 2001), and this nerve makes its first synapse in the caudal subnuclei of the spinal trigeminal nucleus, previously shown to play a role in the signaling pathway after local LPS inflammation (Navarro et al. 2006) and based on the fact that several studies have shown that the caudal part of the spinal trigeminal nucleus is a key site that relays inflammatory (Chattipakorn et al. 2002) and nociceptive input from orofacial structures (Sessle 1986) including the dentition (Byers et al. 2000). The POA is known to be the main thermointegrative and thermosensitive site of the central nervous system (Blatteis and Sehic 1997; Blatteis et al. 2000; Kluger 1991; Nagashima et al. 2000; Steiner et al. 2002).

In conclusion, the present data are consistent with the notion that rats develop endotoxin tolerance after repeated LPS administrations in the oral cavity and central NO plays a key role in this mechanism by modulating neuronal activity in key regions of the CNS, in despite of the maintained peripheral input. This notion is not only supported by measurements of body temperature but also by using immunohistochemistry which detected an enhanced LPS-induced *c-fos* expression in the subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus and in the POA in tolerant rats pretreated with L-NMMA.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank 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 Anastácio is recipient of FAPESP technician scholarship. Valeria P. Navarro is a recipient of a FAPESP graduate scholarship.

REFERENCES

- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Branco, L.G.S., Romanovsky, A.A. 2006. Neural Substrate of Cold-Seeking Behavior in Endotoxin Shock. PLoS ONE. 1(1): e1. doi:10.1371/journal.pone.0000001.
- Almeida, M.C., Trevisan, F.N., Barros, R.C., Carnio, E.C., Branco, L.G. 1999. Tolerance to lipopolysaccharide is related to the nitric oxide pathway. Neuroreport. 10: 3061-3065.
- Beeson, P.B. 1947. Tolerance to bacterial pyrogens. Factors influencing in development. J Exp Med. 86: 29-38.
- Beishuizen, A., Thijs, L.G. 2003. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. J Endotoxin Res. 9(1): 3-24.
- Blatteis, C.M. and Sehic, E. 1997. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain. NIPS. 12: 1-9.
- Blatteis, C.M., Sehic, E., Li, S. 2000. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. Clin Infect Dis. 31: 168-177.
- Byers, M.R., Chudler, E.H., Iadarola, M.J. 2000. Chronic tooth pulp inflammation causes transient and persistent expression of fos in dynorphin-rich regions of rat brainstem. Brain Res. 861: 191-207.
- Byers, M.R., Dong, W.K. 1989. 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.
- Chattipakorn, S.C., Sigurdsson, A., Light, A.R., Narhi, M., Maixner, W. 2002. Trigeminal *c-fos* expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. Pain. 99: 61-69.
- Daniluk, T., Tokajuk, G., Cylwik-Rokicka, D., Rozkiewicz, D., Zaremba, M.L., Stokowska, W. 2006. Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease. Adv Med Sci. 51 Suppl 1: 81-85.
- Dias, M.B., Almeida, M.C., Carnio, E.C., Branco, L.G. 2005. Role of nitric oxide in tolerance to lipopolysaccharide in mice. J Appl Physiol. 98: 1322-1327.
- Franklin, A.E., Engeland, C.G., Kavaliers, M., Ossenkopp, K.P. 2007. The rate of behavioral tolerance development to repeated lipopolysaccharide treatments depends upon the time of injection during the light-dark cycle: a multivariable examination of locomotor activity. Behav Brain Res. 180(2): 161-173.

- Freudenberg, M.A., Salômao, R., Sing, A., Mitov, I. and Galanos, C. 1998. Reconciling the concepts of endotoxin sensitization and tolerance. *Prog Clin Biol Res.* 397: 261-268.
- Griffith, O.W., Stuehr, D.J. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol.* 57: 707-736.
- Ivanov, A.I., Kulchitsky, V.A., Surgimoto, N., Simons, T. and Romanovsky, A.A. 2000. Does the formation of lipopolysaccharide tolerance require intact vagal innervation of the liver? *Auton Neurosci.* 85: 111-118.
- Kluger, M.J. 1991. Fever: Role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev.* 71 (1): 93-127.
- Lazarov, N.E. 2001. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol.* 66: 19-59.
- Lindberg, A.A., Greisman, S.E., Svenson, S.B. 1983. Induction of endotoxin tolerance with nonpyrogenic O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates. *Infect Immun.* 41(3): 888-895.
- Magdalena, C.M., Navarro, V.P., Park, D.M., Stuani, M.B.S., Rocha, M.J.A. 2004. *c-fos* expression in the rat brain nuclei following incisor tooth movement. *J Dent Res.* 83: 50–54.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43: 109-142.
- Monda, M., Amaro, S., Sullo, A., De Luca, B. 1995. Nitric oxide reduces body temperature and sympathetic input to brown adipose tissues during PGE₁-hypothermia. *Brain Res Bull.* 38: 489-493.
- Nagashima, K., Nakai, S., Tanaka, M., Kanosue, K. 2000. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci.* 85: 18–25.
- Nagashima, T., Ohinata, H., Kuroshima, A. 1994. Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. *Life Sci.* 54: 17-25.
- Navarro, V.P., Iyomasa, M.M., Leite-Panissi, C.R.A., Branco, L.G. 2006. New role of trigeminal nerve as a thermoafferent neuronal pathway signaling brain in acute periodontitis: participation of local prostaglandins. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 453: 73–82.
- Navarro, V.P., Rocha, M.J.A., Branco, L.G. 2007. Reduced central *c-fos* expression and the febrile response to repeated LPS injection into the periodontal tissue of rats. *Brain Res.* 1152: 57- 63.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 16-333(6174): 664-666.

Paster, B.J., Boches, J.L., Galvin, R.E., Ericson, C.N., Lau, V.A., et al. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 183: 3770-3783.

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

Piao, W., Song, C., Chen, H., Wahl, L.M., Fitzgerald, K.A., O'Neill, L.A., Medvedev, A.E. 2007. Tyrosine phosphorylation of MyD88 adapter-like (Mal) is critical for signal transduction and blocked in endotoxin tolerance. *J Biol Chem.* 10 (in press).

Scammell, T.E., Elmquist, J.K., Saper, C.B. 1996. Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* 271: R333- R338.

Sessle, B.J. 1986. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J Endod.* 12: 435–444.

Soszynski, D., Kozak, W., Szewczenko, M. 1991. Course of fever response to repeated administration of sublethal doses of lipopolysaccharides, polyinosinic:polycytidylic acid and muramyl dipeptide to rabbits. *Experientia.* 47: 43-47.

Steiner, A.A., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L.G. 2002. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain Res.* 944(1–2): 135–145.

Steiner, A.A., Antunes-Rodrigues, J., McCann, S.M., Branco, L.G. 2002. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the brain. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* 282: R584-R593.

Steiner, A.A., Branco, L.G. 2001. Nitric oxide in the thermoregulation of body temperature and fever. *J Therm Biol.* 26: 325-330.

Steiner, A.A., Branco, L.G. 2002. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. *Annu Rev Physiol.* 64: 263-288. Review.

Steiner, A.A., Rudaya, A.Y., Ivanov, A.I., Romanovsky, A.A. 2004. Febrigenic signaling to the brain does not involve nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 141: 1204- 1213.

Taylor, W.F., Bishop, V.S. 1993. A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 264: H1355- H1359.

West, M.A. and Heagy, W. 2002. Endotoxin tolerance: a review. *Crit Care Med.* 30(1): S64-S73.

Wilkinson, M.F., Kasting, N.W. 1990. Centrally acting vasopressin contributes to endotoxin tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 258: 443-449.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Body core temperature responses to repeated saline or LPS (100 µg/kg) (arrows) injected into the periodontal protection tissue of rats on the first (A), second (B), and third (C) days of injections and saline or L-NMMA (500 µg/rat i.c.v.) on the third day 30 minutes before LPS (arrow) (C). The number of animals per group is shown in parentheses. The values are means±SEM (* $p < 0.05$ compared with saline-treated group).

Fig. 2 Photomicrographs of subnucleus caudalis of spinal trigeminal nucleus showing Fos-IR neurons after saline or LPS (100 µg/kg) injection on periodontium (days 1 and 3) and L-NMMA or saline i.c.v. (day 3). The negative control group did not show any labeled neuron. The coronal schematics in the upper panels show the localization of the area in light gray. Sp5C, caudal part of spinal trigeminal nucleus. A1: saline day 1, A2: saline day 3, A3: saline (i.c.v.) and saline day 3, B1: LPS (100 µg/kg) day 1, B2: LPS (100 µg/kg) day 3, B3: L-NMMA (500 µg/rat i.c.v.) and LPS (100 µg/kg) day 3.

Fig. 3 Photomicrographs of preoptic area of hypothalamus showing Fos-IR neurons after saline or LPS (100 µg/kg) injection on periodontium (days 1 and 3) and L-NMMA or saline i.c.v. (day 3). The negative control group did not show any labeled neuron. The coronal schematics in the upper panels show the localization of the areas in light gray. POA, preoptic area; 3V, third ventricle. A1: saline day 1, A2: saline day 3, A3: saline (i.c.v.) and saline day 3, B1: LPS (100 µg/kg) day 1, B2: LPS (100 µg/kg) day 3, B3: L-NMMA (500 µg/rat i.c.v.) and LPS (100 µg/kg) day 3.

Fig. 4 Effect of periodontium LPS injection (100 µg/kg) on days one and three and L-NMMA (i.c.v.) administration on the third day on *c-fos* expression. The control animals were treated with sterile saline. The number of animals per group is shown in parentheses. Bars represent the average±SEM 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). The negative control group did not show any labeled neuron.

Fig. 1

S. CAUDALIS

A - SALINE

B - LPS

100 μ m

Fig. 2

Fig. 4

ANEXO 3 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 06.1.142.53.8), intitulado: "Tolerância à Endotoxina no Periodonto de Ratos: Participação do óxido nítrico", de autoria de **Valéria Pontelli Navarro Tedeschi**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 04.05.06

Ribeirão Preto, 5 de maio de 2006

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada à 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/ Dezembro 2009
Avenida do Café, s/n CEP 14040-904
e-mail: valeriapontelli@forp.usp.br