



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia

RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E NA INGESTÃO DE ÁGUA e NaCl
HIPERTÔNICO EM RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL TRATADOS COM
AGONISTA GABA_A NO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL

TALITA DE MELO E SILVA

Araçatuba-SP
2012

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia**

**RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E NA INGESTÃO DE ÁGUA e NaCl
HIPERTÔNICO EM RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL TRATADOS COM
AGONISTA GABA_A NO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Callera

Araçatuba
2012

Dedicatória

Aos meus pais, meus verdadeiros mestres, modelos reais de perseverança, fortaleza, dedicação, paciência e amor.

Em especial a minha Mãe Maria de Melo, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho, o qual se tornou indispensável e fundamental para superar todos os obstáculos durante o percurso.

Ao meu amado Pai Vilmar de Almeida pela força, inspiração, carinho e imenso amor e ao meu irmão Danilo de Melo pelo grande incentivo.

A minha avó Ondina Maria de Melo pelas orações e palavras de carinho.

Ao meu eterno namorado Pedro Evaristo pelo amor, apoio, paciência e extrema compreensão.

A minha amiga irmã Anne Muryel pela amizade sincera e verdadeira.

A todos que amo, agradeço a compreensão de que o tempo que passamos longe não foi em vão.

Agradecimientos

Devo a conclusão desta dissertação ao suporte intelectual do orientador Dr. João Carlos Callera.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas- Fisiologia- UNESP- Araçatuba e do Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, por todo o conhecimento transmitido nestes dois anos, expresso meu respeito.

Ao órgão de fomento CAPES pela concessão da bolsa.

Aos funcionários do DCB, em especial a Arnaldo Cesar dos Santos por ajudar a cuidar dos animais. A equipe do Laboratório de Radiologia, Cidinha e professora Leda.

Aos companheiros de laboratório, Rita de Cássia e Gean Domingos pela colaboração e incentivo para a realização deste trabalho. Em especial a Gabriela Patrício Bearari pela contribuição e principalmente pela amizade cultivada durante o árduo desenvolvimento de nosso trabalho.

Aos companheiros e amigos, alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado, pelo auxílio na execução deste trabalho.

A Paula A. Lion e toda sua família pelo incentivo, apoio e extrema confiança. A Natália Manrique pela amizade verdadeira e as grandes amigas de faculdade que sempre me apóiam.

A todos expresso minha mais profunda gratidão...

Epígrafe

*“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente
aprende.”*

Guimarães Rosa

Resumo

SILVA, TM. **Respostas cardiovasculares e na ingestão de água e NaCl hipertônico em ratos com doença periodontal tratados com agonista GABA_A no núcleo parabraquial lateral.** 2012. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), Araçatuba, 2012.

RESUMO

Injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de muscimol, agonista de receptores GABA_A, promove aumento de pressão arterial e induz ingestão de NaCl 0.3 M e água em ratos normovolêmicos, saciados e depletados de sódio. A doença periodontal é uma condição inflamatória que promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α e a destruição das estruturas de suporte do dente. As citocinas pró-inflamatórias podem modular a neurotransmissão GABAérgica e ativar neurônios do NPBL.

Neste estudo, investigamos o efeito da ativação GABAérgica no NPBL com muscimol na ingestão de NaCl hipertônico e água e parâmetros cardiovasculares em ratos normovolêmicos, saciados e depletados pelo modelo FURO+CAP com doença periodontal. Foram utilizados ratos Wistar divididos em dois grupos: com doença periodontal induzida por ligadura (DP) e sem doença periodontal (grupo controle). Quinze (15) dias após a indução da doença periodontal em ambos os grupos foram implantadas cânulas bilaterais no NPBL. Ratos saciados controles que receberam injeções bilaterais no NPBL de muscimol tiveram aumento na ingestão de NaCl 0.3 M (15.8 ± 2.4 vs. salina: 0.2 ± 0.1 ml/180 min) e água (14.2 ± 1.2 vs. salina: 0.6 ± 0.3 ml/180 min). Em ratos saciados com doença periodontal houve aumento significativo da ingestão de NaCl 0.3 M e água, porém a ingestão de água em ratos com doença periodontal foi significativamente menor (6.0 ± 1.4 vs. controle: 14.2 ± 1.2 ml/210 min). Injeções de muscimol no NPBL de ratos tratados com FURO+CAP (grupo controle),

promoveu aumento significativo na ingestão de NaCl 0.3 M (25.9 ± 5.8 e vs. salina: 5.7 ± 1.0 ml/180 min) e água (19.9 ± 1.2 vs. salina: 11.2 ± 1.0 ml/180 min). Em ratos com doença periodontal e tratados com FURO+CAP, injeções de muscimol não promoveu aumento significativo na ingestão de NaCl 0.3 M (10.9 ± 2.92 vs. salina: 5.6 ± 1.3 ml/210 min) e água (13.4 ± 2.3 vs. salina: 8.2 ± 1.5 ml/210 min). Em ratos saciados e tratados com FURO+CAP, a doença periodontal sozinha não modificou a ingestão de sódio e água. Em ratos saciados (grupo controle) foram observados aumento na PAM (15 ± 3.3 mmHg, vs. salina: 0.6 ± 1.3 mmHg) e FC (36 ± 6.8 bpm, vs. salina: 4.1 ± 2.0 bpm), 3 horas após injeções no NPBL de muscimol e a doença periodontal reduziu a resposta pressora do muscimol (7.5 ± 3.1 mmHg vs. controle: 15 ± 3.3 mmHg/3 h). 28 dias após indução da doença periodontal, os ratos apresentaram perda óssea alveolar (1.29 ± 0.04 mm vs. controle: 0.50 ± 0.02 mm) e aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 (40.41 ± 0.25 vs. controle: 38.87 ± 0.23 pg/ml) e TNF- α (14.58 ± 1.73 vs. controle: 3.39 ± 0.33 pg/ml).

Os resultados sugerem que a ativação do sistema imunológico pela doença periodontal foi capaz de reduzir a resposta pressora e os efeitos dispsogênicos e natriorexigênicos induzidos pela ativação GABAérgica com muscimol injetado no NPBL em ratos saciados e tratados com FURO+CAP, provavelmente devido ao aumento da concentração plasmática de IL-6 e TNF- α .

Palavras-chave: Receptores GABA; Doença Periodontal; Muscimol; Appetite ao sódio; Sede; Núcleo Parabraquial Lateral.

Abstract

SILVA, TM. **Experimental periodontitis reduces water and sodium intake induced by injection of muscimol into the lateral parabrachial nucleus.** 2012. [Master degree]. Multicentric Graduated Program in Physiological Sciences at Universidade Estadual Paulista (UNESP) and Brazilian Society of Physiology (SBFis), Araçatuba, 2012.

ABSTRACT

GABA_A receptor activation with muscimol in the lateral parabrachial nucleus (LPBN) induces water and hypertonic sodium chloride (NaCl) intake in rats. The purpose of this study was to investigate whether local inflammatory event, such as periodontal disease, is able to alter the effects of injections of muscimol (GABA_A receptor agonist) into the LPBN on water and 0.3 M NaCl intake in fluid replete rats and in rats treated with diuretic furosemide (FURO) combined with a low dose of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril (CAP) injected subcutaneously.

Male Wistar rats were divided into two groups: with experimental ligature-induced periodontal disease (PD) and those without PD (control conditions). Fifteen days after application of the ligature, both groups had cannulas implanted bilaterally into the LPBN, and were given simultaneous access to water and 0.3 M NaCl intake.

In fluid replete rats without PD, injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) into the LPBN induced 0.3 M NaCl intake (15.8 ± 2.4 vs. saline: 0.2 ± 0.05 ml/210 min), water intake (14.2 ± 1.2 vs. saline: 0.6 ± 0.3 ml/210 min) and pressor response (15 ± 3.3 mmHg, vs. saline: 0.6 ± 1.3 mmHg). In fluid replete rats (PD group), a decrease was observed in water intake (6.0 ± 1.4 ml/210 min), pressor response (7.5 ± 3.1 mmHg), but not in 0.3 M NaCl intake induced by muscimol. In rats with FURO + CAP-treatment (control group), injections of muscimol into the LPBN increased 0.3 M NaCl (25.9 ± 5.8 vs. saline: 5.7 ± 1.0 ml/210 min) and water intake (19.9 ± 1.2 vs. saline: 11.2 ± 1.0 ml/210 min). In rats with FURO + CAP-treatment (PD group), a decrease

was observed in 0.3 M NaCl intake (10.9 ± 2.9 ml/210 min) and water intake (13.4 ± 2.3 ml/210 min) after muscimol injection into the LPBN. IL-6 (40.41 ± 0.25 vs. control: 38.87 ± 0.23 pg/ml) and TNF- α (14.58 ± 1.73 vs. control: 3.39 ± 0.33 pg/ml) plasmatic concentrations and alveolar bone loss (1.29 ± 0.04 mm vs. control: 0.50 ± 0.02 mm), was higher in PD rats in comparison with controls.

The present results suggest that activation of immunologic system by experimental ligature-induced PD is able to reduce pressor response and the dipsogenic and natriorexigenic effects induced by activation of GABA_A receptors with muscimol injected into the LPBN in fluid replete rats and FURO+CAP-treated rats, probably due to the elevation of plasmatic concentration of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α .

Keywords: GABA receptors; periodontal disease; muscimol; sodium appetite; thirst; lateral parabrachial nucleus

Figuras

Figura 1.	Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicado pelas setas)	44
Figura 2.	Radiografia de mandíbula de um rato representativo do grupo controle com histologia positiva para injeções bilaterais no NPBL	46
Figura 3.	Radiografia de mandíbula de um rato representativo do grupo com doença periodontal com histologia positiva para injeções bilaterais no NPBL	46
Figura 4.	Medida da distância da JCE à crista óssea alveolar (mm) de ratos controle e com 28 dias de ligadura caracterizando doença periodontal. O gráfico A representa a média dos valores da distância, o gráfico B representa os valores individuais da distância	47
Figura 5.	Ingestão cumulativa diária de água (A) e NaCl 0.3 M (B) de ratos com 240/250g controle e com doença periodontal	49
Figura 6.	Ingestão cumulativa diária de água (A) e NaCl 0.3 M (B) de ratos com 290/310g controle e com doença periodontal	50
Figura 7.	Efeito de injeções bilaterais no NPBL de muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) e salina na ingestão de NaCl 0.3 M (A) e água (B) em ratos saciados controle e com doença periodontal	52
Figura 8.	Efeito de injeções bilaterais no NPBL de muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) e salina na ingestão de NaCl 0.3 M (A) e água (B) em ratos depletados controle e com doença periodontal	54
Figura 9.	Efeito de injeções bilaterais no NPBL de muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) e salina na pressão arterial média mmHg (A) e	56

frequência cardíaca bpm (B) em ratos saciados controles e com doença periodontal.

- Figura 10.** Níveis plasmáticos de IL-6 de ratos controle e com doença periodontal 58
- Figura 11.** Níveis plasmáticos de TNF- α de ratos controle e com doença periodontal 60

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG II - angiotensina II

AP - área postrema

BNST- núcleo leito da estria terminal

bpm – batimentos por minuto

CAP - captopril

CCK- colecistocinina

CeA- núcleo central da amígdala

CN- controle

DNQX- 6,7-dinitro-quinoxalina-2,3-diona

DP- doença periodontal

ECA-enzima conversora de angiotensina

E.P.M.- erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

FURO – furosemida

g- grama(s)

GABA – ácido γ -aminobutírico

h- hora(s)

i.c.v. - intracerebroventricular

IL- interleucina

i.p. – intraperitoneal

JCE- junção cimento esmalte

Kg- quilograma

Kvp-quilovoltagem pico

M- molar

mA- miliampere(s)

mg- miligrama(s)

min – minuto(s)

ml- mililitro(s)

mm – milímetro(s)

mmHg – milímetros de mercúrio

NaCl – cloreto de sódio

nmol- nanomol(es)

NPBL – núcleo parabraquial lateral

NTS- núcleo do trato solitário

NTSm – núcleo do trato solitário medial

PAM – pressão arterial média

PE- polietileno

pg- pico grama

PVN- núcleo paraventricular do hipotálamo

s.c. – subcutânea

SNC – sistema nervoso central

TNF- fator de necrose tumoral

VLM- bulbo ventrolateral

vs- versus

%- por cento

α – alfa

β - beta

γ - gama

< - menor

> - maior

$\pm$ - mais ou menos

μ l – microlitro(s)

μ m- micrometro(s)

5-HT- serotonina

Sumário

1.0	INTRODUÇÃO	26
2.0	OBJETIVOS	32
3.0	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais	34
3.2	Indução da doença periodontal	34
3.3	Avaliação da ingestão diária	34
3.4	Implante de cânulas de aço inoxidável no NPBL	35
3.5	Injeção das drogas no NPBL	36
3.6	Drogas utilizadas	36
3.7	Depleção aguda de sódio e água (modelo furo + cap)	36
3.8	Canulação da artéria femoral	37
3.9	Registro da pressão arterial (mmhg) e da frequência cardíaca (bpm)	37
3.10	Determinação dos níveis de IL-6 e TNF α do plasma de ratos com doença periodontal	37
3.11	Histologia cerebral	38
3.12	Tomada radiográfica e análise digital	38
3.13	Análise estatística dos resultados	39
3.14	Protocolos Experimentais	40
3.14.1	Efeito de injeções bilaterais no NPBL de muscimol na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos saciados controle e	40

	com doença periodontal	
3.14.2	Efeitos de injeções bilaterais no NPBL de muscimol na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos controle e com doença periodontal depletados de sódio	40
3.14.3	Efeitos cardiovasculares de injeções bilaterais no NPBL de muscimol em ratos saciados controle e com doença periodontal	41
4.0	RESULTADOS	44
4.1	Análise histológica	44
4.2	Análise radiográfica	45
4.3	Ingestão de água e NaCl 0.3 M de ratos controle e com doença periodontal	48
4.4	Efeito de injeções bilaterais no NPBL de muscimol na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos saciados	51
4.5	Efeito de injeções bilaterais no NPBL de muscimol na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos depletados com FURO + CAP	53
4.6	Efeito de injeções bilaterais no NPBL de muscimol na pressão arterial média e frequência cardíaca (bpm) em ratos saciados controles e com doença periodontal	55
4.7	Níveis de IL-6 do plasma de ratos controle e com doença periodontal	57
4.8	Níveis de TNF- α do plasma de ratos controle e com doença	59

periodontal

5.0	DISCUSSÃO	62
6.0	CONCLUSÃO	69
7.0	REFERÊNCIAS	71
8.0	ANEXOS	83
1.0	Radiografias de mandíbulas de ratos controles.	84
2.0	Radiografias de mandíbulas de ratos com doença periodontal.	85
3.0	Certificado comissão de ética na experimental animal (CEEA)	86

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A água é responsável por cerca de 60% do peso corporal, dois terços no compartimento intracelular e um terço no compartimento extracelular. A regulação do volume dos líquidos corporais e da osmolaridade plasmática ocorre por uma adequada ingestão e excreção de água e sódio, sendo fundamental para a sobrevivência das células (DE LUCA et al., 2005).

O sódio é constituinte do compartimento extracelular e o maior determinante da osmolaridade e do volume do líquido extracelular, por isso sua quantia deve ser mantida dentro de estreitos limites de variação para assegurar um funcionamento ideal de inúmeros processos fisiológicos (FITZSIMONS, 1998).

A manutenção da quantidade e concentração dos líquidos corporais é controlada por diferentes mecanismos ativados em situações de alterações de volume e osmolaridade dos líquidos corporais e a ativação desses mecanismos permite manter o equilíbrio hidroeletrolítico do organismo. Em condições de manutenção da homeostase, receptores localizados em diversas partes do organismo ou hormônios produzidos, sinalizam para algumas regiões específicas do encéfalo, que quando ativadas, desencadeiam respostas renais e/ou comportamento de busca por água e sódio (JOHNSON; EDWARDS, 1990; THUNHORST; JOHNSON, 1994).

Com a síntese da furosemida (FURO) em 1962 que promove diurese e natriurese e conseqüentemente uma depleção aguda de sódio e água, foi possível a elaboração de estudos sobre os mecanismos de ingestão de água e sódio. A técnica de depleção de sódio induzida pelo tratamento com Furosemide seguido por 24 horas de dieta deficiente de sódio tem sido muito utilizada para pesquisas dos mecanismos de sede e apetite ao sódio (EPSTEIN et al., 1970; DENTON, 1984; FITZSIMONS, 1998; DE OLIVEIRA et al., 2007). Outra técnica utilizada para estudo dos mecanismos de ingestão foi a associação de furosemida com doses baixas de um inibidor da enzima

conversora de angiotensina (captopril) que promove ingestão de sódio hipertônico (NaCl 0.3 M) devido a formação de angiotensina II no SNC, sugerindo a importante participação do sistema renina-angiotensina na ingestão de água e sódio (THUNHORST; JOHNSON, 1994).

Entre as áreas posteriores do SNC envolvidas na regulação hidroeletrólítica, o núcleo parabraquial lateral (NPBL) localizado na ponte, dorsal ao pedúnculo cerebelar superior tem recebido bastante atenção (OHMAN; JOHNSON, 1989; MENANI et al., 1996; MENANI; JOHNSON, 1998; CALLERA et al., 2005; KIMURA et al., 2008; DE GOBBI et al., 2009; ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010; MENEZES et al., 2011; ANDRADE et al., 2012). O NPBL recebe fibras provenientes de áreas posteriores do encéfalo envolvidas com o controle hidroeletrólítico, como a área postrema e a porção medial do núcleo do trato solitário (NTS) (SHAPIRO; MISELIS, 1985; HERBERT et al., 1990) e envia projeções para áreas anteriores do cérebro como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo central da amígdala (CeA) (CIRIELLO et al., 1984; JHAMANDAS et al., 1996).

O NPBL tem um papel inibitório no controle da ingestão de água e sódio (EDWARDS; JOHNSON, 1991; MENANI et al., 1996; MENANI; JOHNSON, 1998, 1998; ANDRADE et al., 2004; CALLERA et al., 2005; DE GOBBI et al., 2000, 2005). Injeção no NPBL de metisergida (antagonista serotoninérgico) ou proglumide (antagonista da colecistocinina) promoveu aumento na ingestão de água e sódio induzida pela angiotensina II intracerebroventricular, pelo tratamento combinado furosemida (FURO) + captopril (CAP) (MENANI et al., 1996; DE GOBBI et al., 2001) e pelo tratamento com FURO seguido de manutenção dos ratos com dieta deficiente em sódio (MENANI et al., 1998). De Gobbi et al. (2001) sugere inclusive, uma interpendência e cooperatividade entre serotonina (5-HT) e colecistocinina (CCK) no NPBL no controle da ingestão de NaCl e água.

Estudos recentes (DE CASTRO E SILVA et al., 2006; DE GOBBI et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2008; ANDRADE et al., 2004; CALLERA et al., 2005), mostraram

que no NPBL, além da 5-HT e CCK, há outros neurotransmissores que participam do controle da ingestão de NaCl. O fator liberador de corticotrofina e o glutamato ativam o mecanismo inibitório do NPBL, limitando a ingestão de sódio, enquanto a ativação de receptores opioideérgicos, adrenérgicos α_2 e GABAérgicos no NPBL bloqueiam o mecanismo inibitório promovendo um aumento na ingestão de NaCl em ratos saciados ou que receberam estímulos para a ingestão de NaCl.

O aminoácido inibitório GABA (ácido γ -aminobutírico) é o mais importante neurotransmissor inibitório nas porções gustatórias e viscerais do NPBL (KOBASHI; BRADLEY, 1998). Dois diferentes subtipos de receptores que o GABA pode ativar são: receptores ionotrópicos GABA_A que são ativados pelo agonista muscimol e bloqueados pelo antagonista bicuculina (AKAIKE et al., 1985) e receptores metabotrópicos GABA_B que são ativados pelo agonista baclofen (BOWERY, 1989).

Estudos anteriores (CALLERA et al., 2005; KIMURA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2007, 2011), foram realizados com o objetivo de avaliar o envolvimento dos mecanismos GABAérgicos no NPBL na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos. Estes estudos, mostraram que a ativação no NPBL de receptores GABAérgicos (GABA_A e GABA_B) com muscimol e baclofen, respectivamente, induziu ingestão de NaCl 0.3 M, além da água, em ratos saciados e tratados com FURO+CAP. Além disso, muscimol injetado no NPBL induziu ingestão de NaCl 0.3 M em ratos hiperosmóticos (tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 12%), tratamento que induz hipernatremia, hiperosmolaridade e redução da renina plasmática, sem redução da volemia (PEREIRA et al., 2002; KIMURA et al., 2008).

A doença periodontal é uma doença crônica de origem infecciosa, comum em humanos, com uma prevalência variando entre 10% e 90% em adultos, dependendo do critério diagnóstico (ALBANDAR; RAMS, 2000; MANAU et al., 2008). Esta doença afeta tecidos periodontais como osso alveolar, ligamento periodontal, cemento e gengiva e sua patogênese envolve respostas imunológicas que podem

promover a perda óssea alveolar por estimular o processo de osteoclastogênese (WENNSTRÖM et al., 1978; BAKER, 2000; TAUBMAN et al., 2005; ALI et al., 2011).

Em ratos, diferentes modelos de indução da doença periodontal têm sido propostos (GRAVES et al., 2008). JHONSON (1975), utilizou o modelo de doença periodontal induzida por ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores e constatou deslocamento da margem gengival, acúmulo de placa bacteriana, aumento de infiltrado inflamatório no tecido subjacente e reabsorção óssea alveolar. O acúmulo de placa bacteriana na região subgengival causa danos ao periodonto por ativar o sistema imunológico do hospedeiro, que promove liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa [TNF- α], interleucina [IL]-1 β , -6 e -8 e proteína C-reativa dos tecidos periodontais inflamados que podem entrar na circulação e desencadear uma resposta inflamatória sistêmica, modificando as respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais coordenadas pelo SNC (BERKENBOSCH et al., 1989; SAPER; BREDER, 1992; AMAR; HAN, 2003; GRAVES, 1999; SEYMOUR; GEMMELL, 2001).

Os organismos respondem a processos inflamatórios através de uma série de ações coordenadas envolvendo o sistema imune, nervoso e endócrino na tentativa de restaurar o balanço homeostático (BREIVIK et al., 2001). Estudos de Breivik et al., (2001), mostraram que a doença periodontal induzida em ratos, promove ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com aumento dos níveis sanguíneos de corticosterona, sugerindo que as citocinas liberadas pelo processo inflamatório informam ao SNC que modula a resposta imune através da liberação de neurotransmissores e hormônios.

Diferentes citocinas interagem com neurotransmissores no SNC (DESIMONI; IMERI, 1998). Estudos eletrofisiológicos, mostraram que IL-1 β pode aumentar (MILLER et al., 1991) ou inibir (PRINGLE et al., 1996) a função dos receptores inibitórios GABA_A. Além disso, aplicação de IL-1 β inibe a atividade de neurônios da área pré-óptica e do hipotálamo anterior aumentando a liberação pré-sináptica de

GABA (TABAREAN et al., 2006). Outros estudos, mostraram que a citocina IL-2 pode interferir com a neurotransmissão GABAérgica, pois IL-2 injetada no hipotálamo medial inibe o comportamento defensivo de fuga através da interação com receptores GABA_A (BHATT et al., 2005). A administração de IL-1 β e IL-6 reduz a frequência de correntes espontâneas pós-sinápticas inibitórias e correntes induzidas por GABA em neurônios da medula espinhal (KAWASAKI et al., 2008) e em neurônios da amígdala (YU; SHINNICK-GALLAGHER, 1994).

O NPBL tem sido reconhecido como uma importante estrutura envolvida com respostas viscerais, comportamentais e autonômicas geradas por estímulos gustatórios, osmóticos e cardiovasculares (BLAIR et al., 2001; CHAMBERLIN; SAPER, 1992; NORGREN, 1995; OHMAN et al., 1989). Evidências sugerem que neurônios do núcleo parabraquial, especialmente aqueles da porção lateral, podem também regular ou modular respostas centrais produzidas pela ativação do sistema imune (BULLER; DAY, 2002; ERICSSON et al., 1994; TKACS; LI, 1999). Tem sido sugerido na literatura que injeções sistêmicas de citocinas podem ativar o NPBL e que, além disso, o NPBL desempenha um papel crítico na expressão da proteína Fos no núcleo central da amígdala (CeA), núcleo leito da estria terminal (BNST) e neurônios do bulbo ventro lateral (VLM) após injeções de IL-1 β (ELMQUIST et al., 1996; BULLER et al., 2004). De acordo com essas informações, podemos sugerir que a inflamação sistêmica pode potencialmente modular diferentes funções do NPBL.

Portanto, de acordo com estudos anteriores que mostram que injeções no NPBL bilateral de muscimol modificam o comportamento de ingestão de água, sódio hipertônico e parâmetros cardiovasculares e que citocinas são capazes de modular o NPBL e também a neurotransmissão GABAérgica, este estudo investigou se o processo inflamatório induzido pela doença periodontal experimental é capaz de alterar o comportamento de ingestão de água e apetite ao sódio e os parâmetros cardiovasculares após injeções no NPBL de muscimol.

Objetivos

2. OBJETIVOS

- 1) Investigar os efeitos da doença periodontal na ingestão de água e NaCl 0.3 M induzida pela ativação dos receptores GABA_A com injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e tratados com FURO+CAP.

- 2) Investigar os efeitos da doença periodontal nas alterações cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) induzidas pela ativação dos receptores GABA_A com injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar fornecidos pelo Biotério Central do “Campus” da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no laboratório sob condições adequadas de umidade ($55\pm 10\%$) e temperatura (22°C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas começando às 7 horas da manhã. Água, NaCl 0.3 M e ração granulada (Guabi) ficaram disponíveis nas gaiolas. Este estudo foi aprovado em 18/02/2010 pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA), de acordo com o protocolo 00516/2010.

3.2. Indução da doença periodontal

Foram utilizados ratos Wistar pesando aproximadamente 240/250 gramas. Os animais receberam anestesia pela associação de Ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e Xilazina (7 mg/kg de peso corporal), aplicados via intraperitoneal e logo após foram posicionados em mesa cirúrgica apropriada para facilitar o acesso aos primeiros molares inferiores.

A doença periodontal (DP), foi induzida por meio da adaptação de um fio de seda número 4-0 (Seda Silk Trançada Ethicon-Johnson & Johnson) ao redor dos primeiros molares inferiores em nível do sulco gengival.

3.3. Avaliação da ingestão de água e NaCl 0.3 M

Para investigar se a doença periodontal sozinha, modifica ou não a ingestão de água e NaCl 0.3 M, foram feitas medidas de ingestão de água e NaCl 0.3 M (ml) durante o período de 24 horas em ratos com 3 dias (pesando entre 240/250 g) e 16 dias (pesando entre 290/310 g) após a indução da doença periodontal. Esses

resultados foram comparados com os valores de ingestão em 24 horas, de água e NaCl 0.3 M em ratos controles (sem a doença periodontal).

3.4. Implante de cânulas de aço inoxidável no NPBL

Dezesseis (16) dias após a indução da doença periodontal, os ratos foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg i.p) e xilazina (7 mg/kg i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (Kopf, USA). Com o auxílio de duas barras auriculares a cabeça do animal foi colocada em posição fixa. Após a assepsia da pele da cabeça com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal e o tecido subcutâneo foi removido, expondo as linhas lambda e bregma que foram utilizadas como referência para nivelar a cabeça do rato no mesmo nível horizontal. Utilizando-se a linha bregma e a linha mediana, foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável, segundo as coordenadas obtidas do atlas histológico de Paxinos e Watson (1997): 9,2 mm caudal ao bregma; 2,2, lateral a linha média e 3,9 mm abaixo da duramater. Nestes pontos foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Cânulas de aço inoxidável (12 mm) confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (25x0,6 mm) foram posicionadas bilateralmente 2 mm acima do NPBL. Essas cânulas foram fixadas ao crânio do rato com resina acrílica de uso odontológico e ancoradas por pequenos parafusos de aço inox, previamente introduzidos no osso. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotáxico foi removida e para impedir a obstrução da cânula guia até a realização dos experimentos, foi introduzido na mesma mandril (12 mm) também de aço inoxidável. Terminada a cirurgia cerebral, os ratos foram devolvidos em suas gaiolas individuais com ração, água e NaCl 0.3 M por um período de pelo menos 4 dias antes do início dos experimentos.

3.5. Injeção das drogas no NPBL

As drogas foram dissolvidas em NaCl 0.15 M e injetadas no NPBL bilateral de ratos, usando-se uma seringa Hamilton de 10 μ l, conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora (30 gauge de diâmetro) que foi introduzida no NPBL através da cânula guia previamente fixada no mesmo. A cânula injetora foi 2 mm mais longa do que a cânula guia. O volume da injeção foi de 0.2 μ l (em cada lado), no NPBL.

3.6. Drogas utilizadas

Hidrobrometo de muscimol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), agonista de receptores GABA_A, administrado no NPBL na dose de 0.5 nmol/0.2 μ l. O diurético, furosemida (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), foi dissolvido em salina e administrado por via subcutânea (sc) na dose de 10 mg/kg. O inibidor da enzima conversora da angiotensina, captopril (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), foi dissolvido em NaCl 0.15 M e administrado por via subcutânea (sc) na dose de 5 mg/kg.

3.7. Depleção aguda de sódio e água (modelo FURO + CAP)

Depleção aguda de sódio e água foi induzida por injeções subcutâneas (s.c) de furosemida (FURO, 10 mg/kg de peso corporal) associado com captopril (CAP, 5 mg/kg de peso corporal), como descrito previamente em estudos anteriores (MENANI et al., 1996; DE GOBBI et al., 2001; CALLERA et al., 2005). Os ratos foram removidos das gaiolas para a injeção de FURO+CAP e em seguida, retornaram as suas respectivas gaiolas na ausência da água, NaCl 0.3 M e ração. Uma hora mais tarde, as buretas contendo água e NaCl 0.3 M foram colocadas nas gaiolas e a

ingestão foi medida de forma cumulativa em intervalos de 30 minutos durante 210 minutos de experimento. Os experimentos tiveram o intervalo de 48 horas.

3.8. Canulação da artéria femoral

Um dia antes dos registros da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), foi realizada a canulação da artéria femoral. As cânulas utilizadas foram confeccionadas previamente com um tubo de polietileno PE-10 de 4 cm, soldado a outro tubo de polietileno PE-50 (17 cm). As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Sob anestesia com ketamina + xilazina, a cânula arterial foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral. Uma vez implantada, a cânula arterial foi exteriorizada na região escapular dorsal do rato, onde foi fixada com linha de sutura e utilizada para o registro da PAM e FC.

3.9. Registro da pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm)

Os registros da PAM e FC foram feitos em ratos saciados e não anestesiados no dia seguinte ao da canulação da artéria femoral. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan Gould P23 Db), o qual foi acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences, Dover, NH, USA) que foi conectado a um sistema de aquisição de dados por computador (modelo PowerLab 16SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA).

3.10. Determinação dos níveis plasmáticos de IL-6 e TNF α

Terminados os experimentos, os ratos foram anestesiados com Pentobarbital sódico (80 mg/kg Cristália, Brazil), e submetidos a abertura da região torácica para

exposição da aorta abdominal. O sangue arterial foi coletado e imediatamente centrifugado por 15 minutos a 3.000 rpm e 4°C. O plasma foi armazenado à -70° C para dosagem das citocinas IL-6 e TNF α pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Foram utilizados *kits* para IL-6 e TNF- α (IL-6 – BD Biosciences, San Diego USA; TNF α – Invitrogen, Camarillo, California, USA). O limite de detecção de IL-6 foi <0.7 pg/ml e TNF α <4 pg/ml.

3.11. Histologia cerebral

Após a coleta de sangue para dosagem de citocinas, os ratos receberam uma injeção no NPBL bilateral do corante Azul de Evans 2% (volume de 0.2 μ l) para determinar o local específico das injeções. A seguir, o coração foi exposto para perfusão cerebral com salina tamponada (30 ml) seguida de perfusão com solução de formalina 10% (30 ml). Para facilitar a perfusão cerebral, a artéria aorta descendente foi bloqueada com pinça hemostática e a cava superior seccionada. A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (60 μ m de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina, foram analisados a fresco para se localizar os pontos das injeções. Somente os ratos que apresentaram marcações no NPBL bilateral foram considerados na análise estatística dos resultados.

3.12. Análise radiográfica

Após a perfusão dos animais, as mandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formalina a 10% e posteriormente foram radiografadas utilizando o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA) operando com fatores energéticos de 60 kVp e 10 mA.

Os espécimes foram posicionados sobre a placa óptica de maneira que as faces proximais dos molares ficaram paralelas ao feixe central de radiação. O tempo de exposição foi de 10 impulsos (ou 0.166 segundos) a uma distância foco-filme de quarenta (40) centímetros.

As placas sensibilizadas pela radiação foram removidas do invólucro e lidas no scanner a laser do Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland), que projeta as imagens diretamente para a tela do computador para serem manipuladas no *software* Digora for Windows 1.51 (COLOMBO et al., 2011). Após a obtenção e a seleção das imagens, foi utilizado a ferramenta distância e ângulo de mensuração do programa. Este recurso possibilitou quantificar as perdas ósseas através da medida da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar na mesial de primeiros molares inferiores de ambos os lados pelo traçado de uma linha e o programa fornece a distância automaticamente, sendo essas medidas registradas em milímetros. Somente os animais que apresentaram reabsorção óssea alveolar foram considerados na análise estatística, pois a reabsorção óssea foi o parâmetro de instalação da DP.

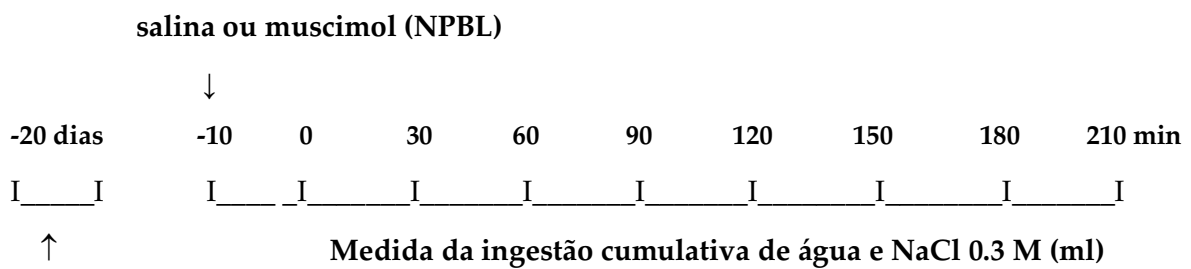
3.13. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ Erro Padrão da Média (E.P.M.). Os efeitos promovidos pelas injeções de muscimol no NPBL na ingestão cumulativa de água e NaCl 0.3 M e nos parâmetros cardiovasculares foram avaliados pela análise de variância duas vias (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls.

As radiografias dos ratos controles e com DP foram analisadas 3 vezes, sendo as mesmas realizadas por um examinador treinado. O teste “t Student” foi empregado para identificar a significância estatística entre as medições. Os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α também foram avaliados pelo teste “t Student”. As diferenças estatísticas foram aceitas como significativas para $p < 0.05$. Para análise dos dados foi utilizado o *software* SigmaStat for Windows, versão 2.03.

3.14. Protocolos experimentais

3.14.1. Efeito de injeções bilaterais de muscimol no NPBL na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos saciados controle e com doença periodontal.



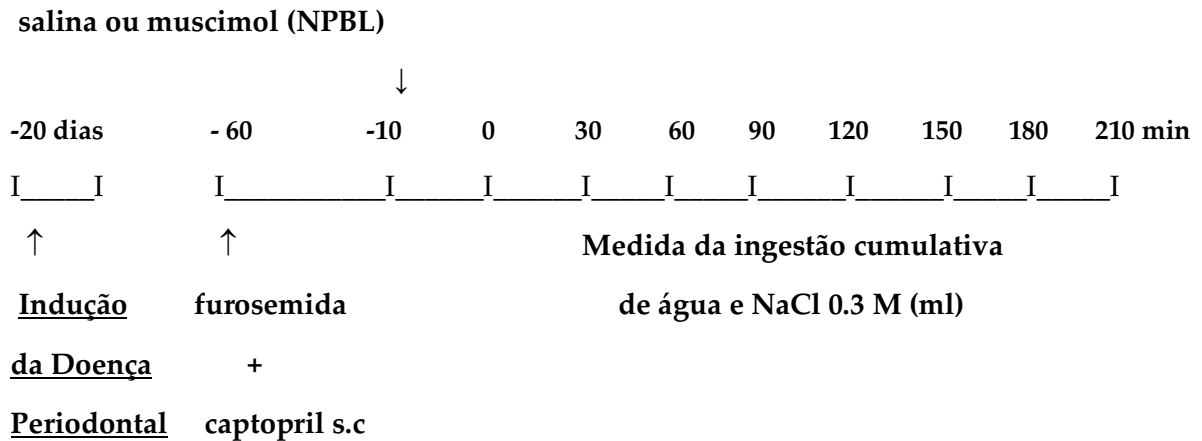
Indução

da Doença

Periodontal

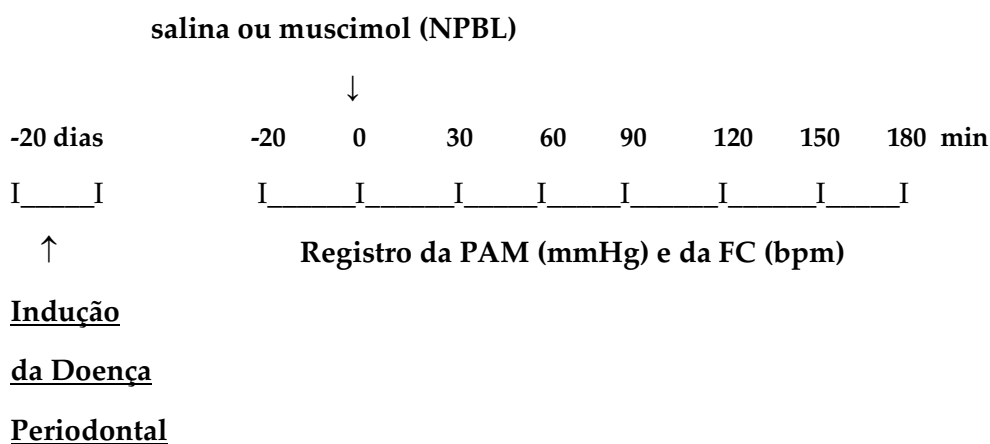
A doença periodontal foi induzida 20 dias antes do início dos experimentos. Injeções bilaterais de salina ou muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) no NPBL de ratos saciados foram feitas 10 minutos antes do início das medidas de ingestão cumulativa a cada 30 minutos durante 210 minutos.

3.14.2. Efeitos de injeções bilaterais de muscimol no NPBL na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos depletados de sódio controle e com doença periodontal.



A doença periodontal foi induzida 20 dias antes do início dos experimentos. Os ratos foram removidos das gaiolas para as injeções subcutâneas de furosemida (10 mg/kg) e captopril (5 mg/kg) e retornaram as suas respectivas gaiolas na ausência da água, NaCl 0.3 M e ração. Uma hora mais tarde, as buretas contendo água e NaCl 0.3 M foram colocadas nas gaiolas e a ingestão foi medida de forma cumulativa em intervalos de 30 minutos durante 210 minutos de experimento. Os ratos depletados receberam injeções no NPBL bilateral de muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) ou salina e 10 minutos após as injeções no NPBL, as buretas foram colocadas nas gaiolas e as medidas de ingestão foram realizadas.

3.14.3. Efeitos cardiovasculares de injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados controles e com doença periodontal.



A doença periodontal foi induzida 20 dias antes do início da medida da PAM e FC em animais saciados normotensos e não anestesiados. Os ratos foram colocados em caixas individuais na ausência de ração, água e NaCl 0.3 M e adaptados ao sistema Powerlab para os registros de PAM e FC. Após um período de adaptação do animal ao local de registro (± 20 min), os animais receberam injeções no NPBL de salina 0,9% (0.2 μ l) ou muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) e os registros de PAM e FC foram feitos a cada 30 minutos por 180 minutos.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Histologia do NPBL

A Figura 1 é uma fotomicrografia de uma secção coronal do tronco encefálico de um rato representativo dos grupos estudados, mostrando o local das injeções do corante Azul de Evans 2% no NPBL bilateral.

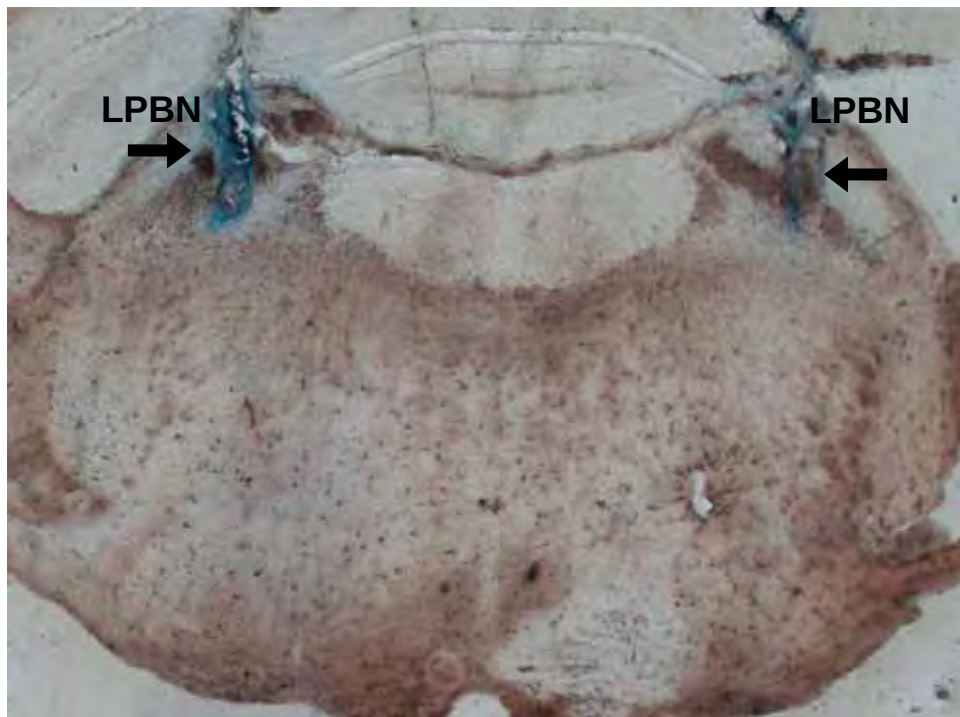


Figura 1. Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados, mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicado pelas setas).

4.2. Análise Radiográfica

O sistema digital radiográfico direto – Digora, foi utilizado para quantificar a perda óssea alveolar nas mandíbulas de ratos com doença periodontal. Este sistema de análise foi utilizado devido à possibilidade de obtermos a imagem radiográfica e transferi-la direto ao computador sem a necessidade de revelação química e escaneamento da radiografia.

A radiografia da mandíbula de um rato representativo dos grupos controle e com doença periodontal que tiveram histologia positiva para injeções bilaterais no NPBL estão apresentadas na figura 2 e 3, respectivamente.

A figura 4 representa os valores da medida da distância da junção cimento esmalte (JCE) à crista óssea alveolar na mesial de ratos controles e com doença periodontal. Os ratos com doença periodontal apresentaram um aumento na distância da JCE à crista óssea (1.29 ± 0.04 vs. controle: 0.5 ± 0.02 mm), caracterizando perda óssea alveolar que é parâmetro indicativo de estabelecimento da doença periodontal.



Figura 2. Radiografia de mandíbula de rato controle.

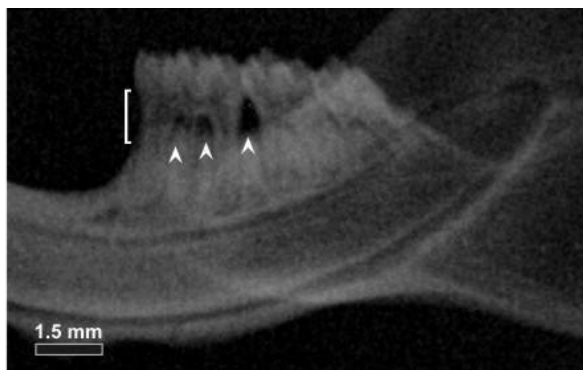


Figura 3. Radiografia de mandíbula de rato com doença periodontal.

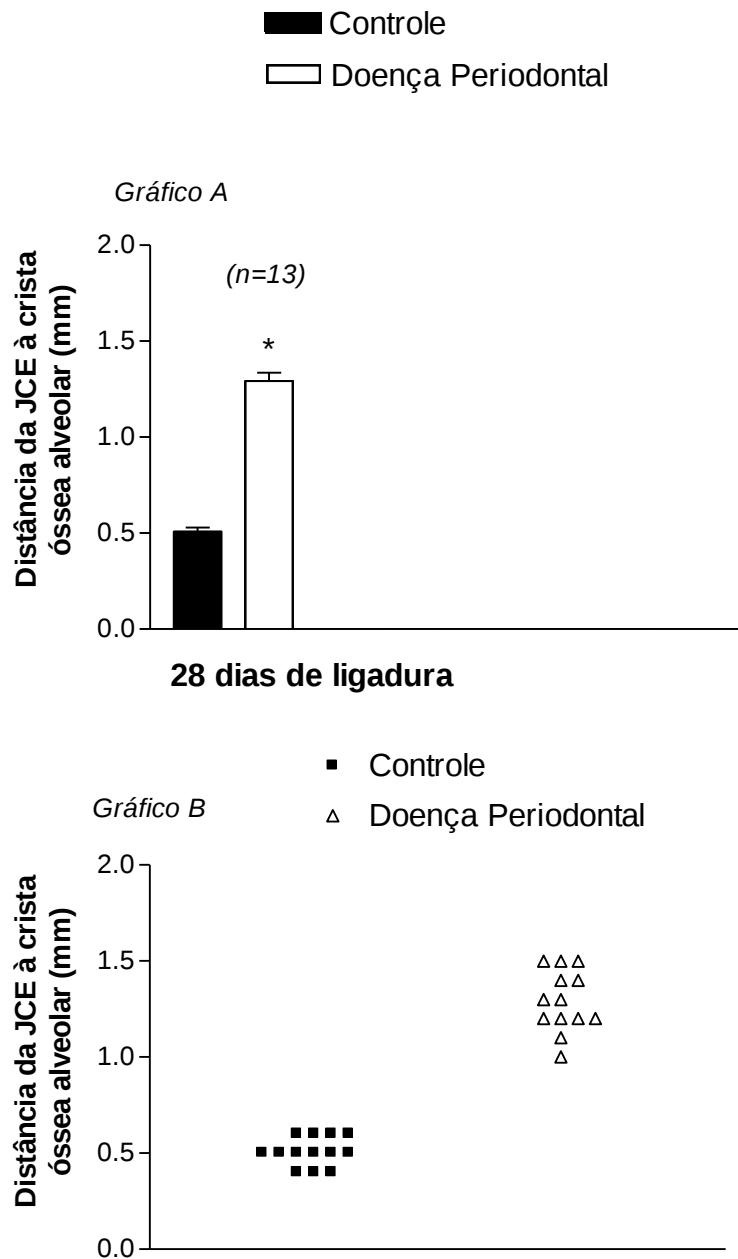


Figura 4. Medida (mm) da distância da JCE à crista óssea alveolar de ratos controles e ratos com 28 dias de ligadura. O gráfico A representa a média dos valores da distância, o gráfico B representa os valores individuais da distância. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM, n = número de ratos, * diferente do grupo controle.

4.3. Ingestão de água e NaCl 0.3 M de ratos controles e com doença periodontal

A Figura 5 representa os valores de ingestão de água e NaCl 0.3 M (ml/24 h) de ratos controles e ratos com 3 dias de indução da doença periodontal, pesando entre 240/250 g. A doença periodontal sozinha não modifica a ingestão de água (24.3 ± 0.2 vs. controle: 26.4 ± 0.3 ml/24 h) e NaCl 0.3 M (0.8 ± 0.3 vs. controle: 0.7 ± 0.2 ml/24 h).

A Figura 6 representa os valores de ingestão de água e NaCl 0.3 M (ml/24 h) de ratos controles e ratos com 16 dias de indução da doença periodontal, pesando entre 290/310 g. A doença periodontal também não modificou a ingestão de água (41.6 ± 1.9 vs. controle: 38.8 ± 1.4 ml/24 h) e NaCl 0.3 M (0.9 ± 0.2 vs. controle: 0.8 ± 0.1 ml/24 h)

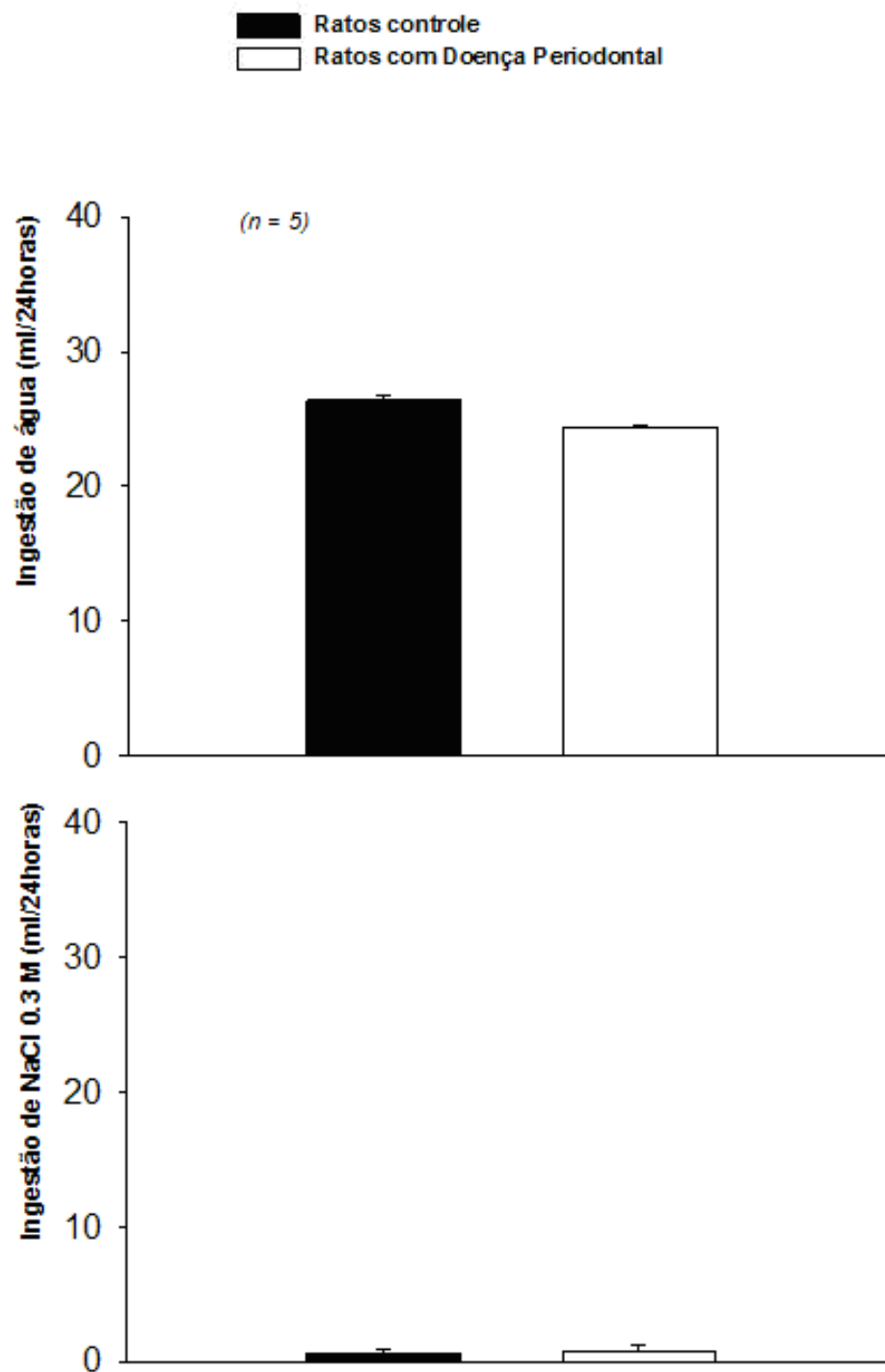


Figura 5. Ingestão de água e NaCl 0.3 M (ml/24 h) de ratos controles e com doença periodontal com peso entre 240/250g. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM, n = número de ratos.

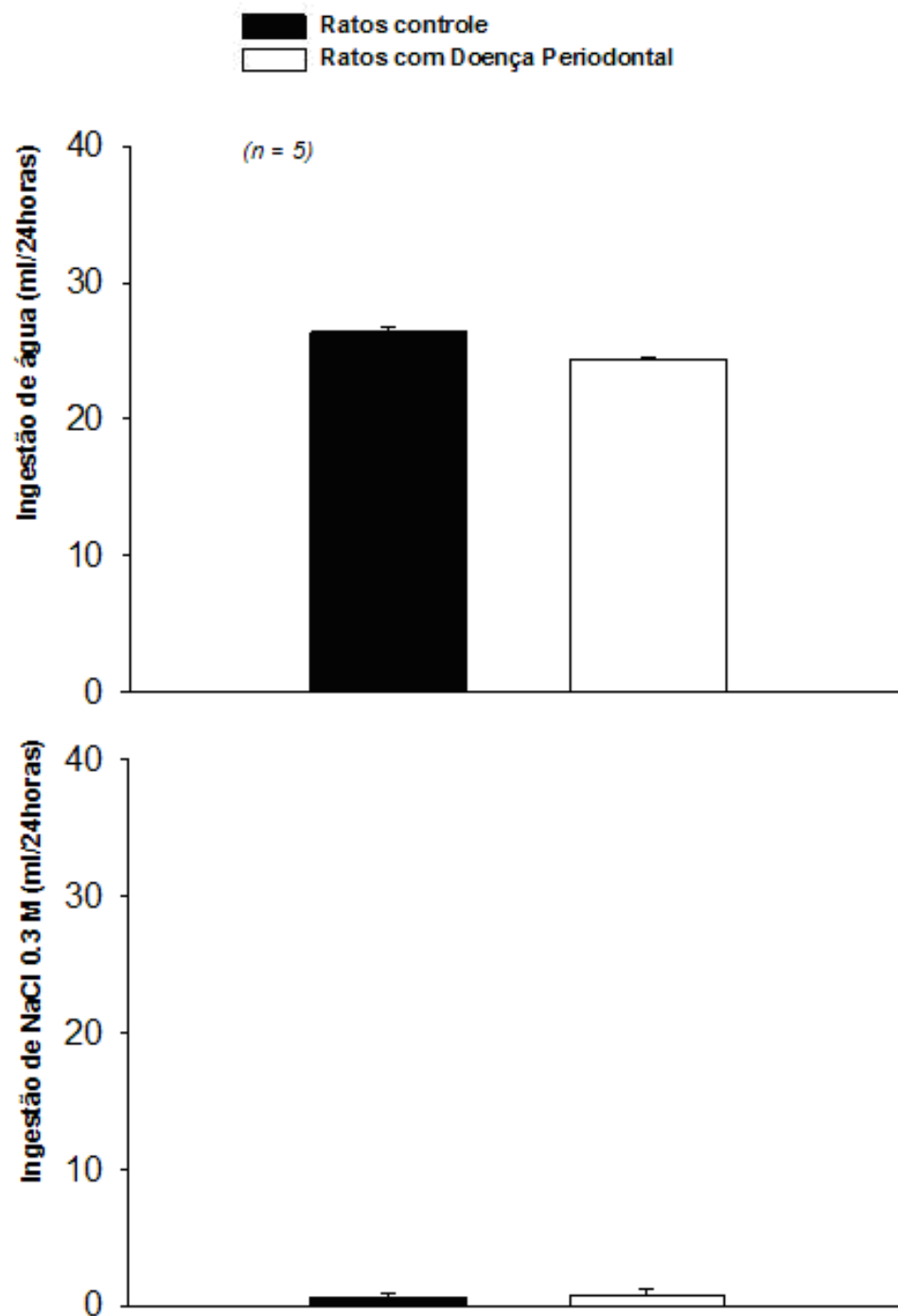


Figura 6. Ingestão de água e NaCl 0.3 M (ml/24 h) de ratos controles e com doença periodontal com peso entre 290/310g. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM, n = número de ratos.

4.4. Efeito de injeções bilaterais de muscimol no NPBL na ingestão de NaCl 0.3 M e água em ratos saciados.

A figura 7 mostra que injeções de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l, n=8) no NPBL de ratos saciados controles induziu aumento significativo da ingestão de NaCl 0.3 M (15.8 ± 2.4 vs. salina: 0.2 ± 0.05 ml/210 min) e água (14.2 ± 1.2 vs. salina: 0.6 ± 0.3 ml/210 min). Em ratos com doença periodontal, injeções no NPBL de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l, n=8) também promoveu aumento significativo da ingestão de NaCl 0.3 M (15.1 ± 4.9 vs. salina: 0.1 ± 0.05 ml/210 min) e água (6.0 ± 1.4 vs. salina: 0.5 ± 0.4 ml/210 min). No entanto, a ingestão de água em ratos com doença periodontal foi significativamente menor comparado com o grupo controle (6.0 ± 1.4 vs. controle: 14.2 ± 1.2 ml/210 min). Em relação à ingestão de NaCl 0.3 M, não houve diferença entre ratos saciados com doença periodontal quando comparado com ratos controle (15.1 ± 4.9 vs. controle: 15.8 ± 2.4 ml/210 min). A doença periodontal sozinha não alterou a ingestão de água (0.5 ± 0.4 vs. salina controle: 0.6 ± 0.3 ml/210 min) e NaCl 0.3 M (0.1 ± 0.05 vs. salina controle: 0.2 ± 0.05 ml/210 min).

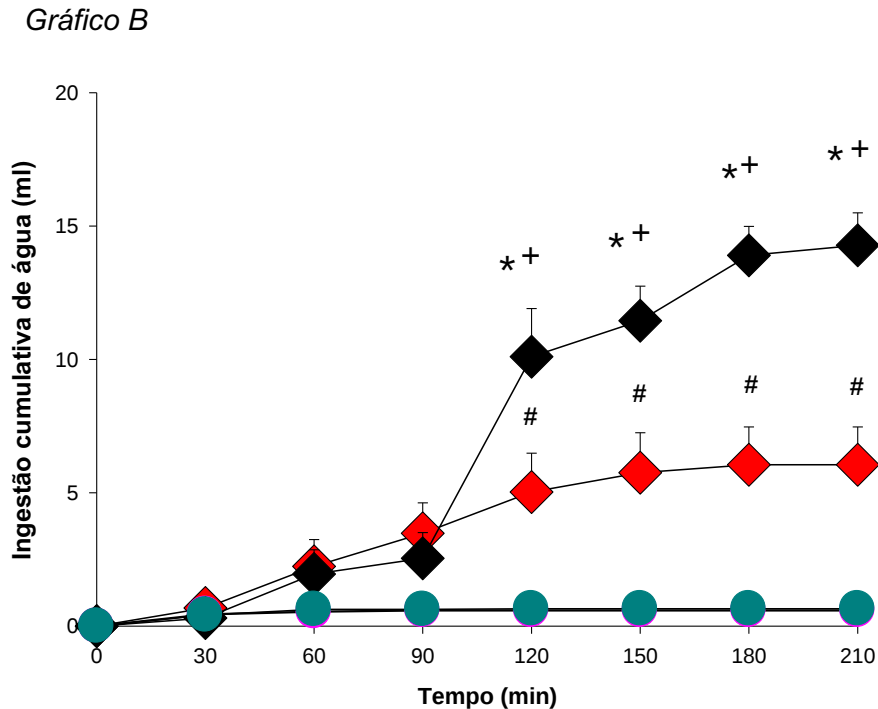
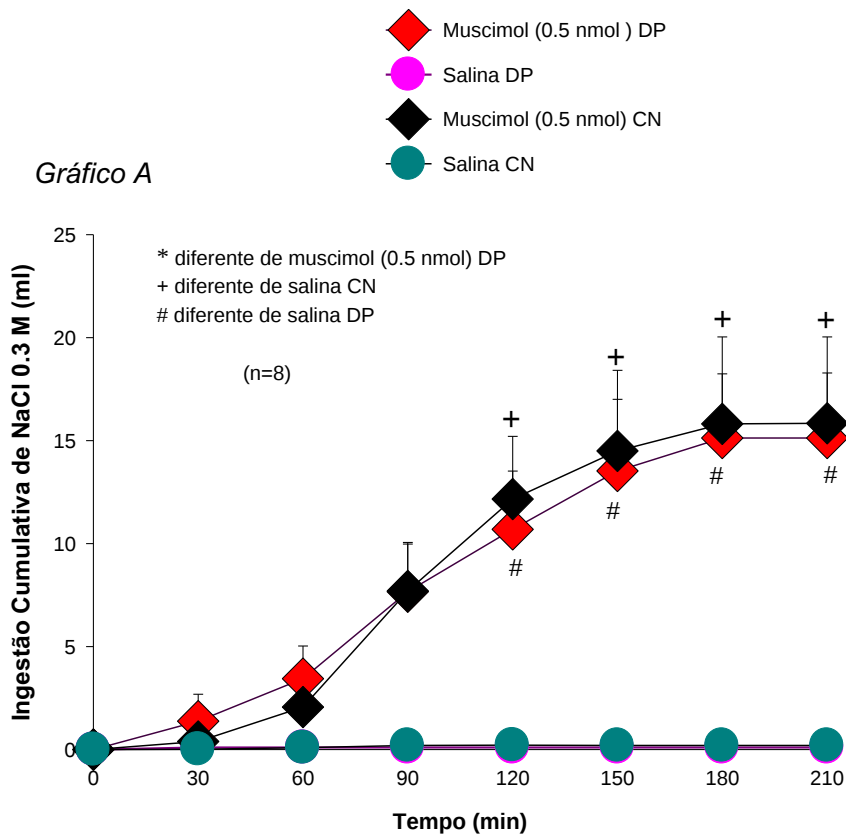


Figura 7. Ingestão cumulativa de NaCl 0.3 M e água em ratos saciados controle (CN) e com doença periodontal (DP) que receberam injeções de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) ou salina no NPBL. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM, n = número de ratos.

4.5. Efeito de injeções bilaterais de muscimol no NPBL na ingestão de NaCl 0.3 M e água em ratos tratados com FURO+CAP.

A figura 8, mostra os resultados da ingestão de NaCl 0.3 M e água induzida por injeções no NPBL do muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l, n=8) em ratos controles e com doença periodontal após a depleção aguda de água e sódio promovido pela administração simultânea do diurético furosemida (10 mg/kg s.c) e baixas doses do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (5 mg/kg s.c).

Injeções de muscimol no NPBL de ratos controle tratados com FURO+CAP promoveu aumento significativo na ingestão de NaCl 0.3 M (25.9 ± 5.8 e vs. salina: 5.7 ± 1.0 ml/210 min) e água (19.9 ± 1.2 vs. salina: 11.2 ± 1.0 ml/210 min). Em ratos com doença periodontal, injeções bilaterais de muscimol não promoveu diferença na ingestão de NaCl 0.3 M (10.9 ± 2.9 vs. salina: 5.6 ± 1.3 ml/210 min) e água (13.4 ± 2.3 vs. salina: 8.2 ± 1.5 ml/210 min). Injeções no NPBL de muscimol em ratos com doença periodontal promoveu diminuição significativa da ingestão de NaCl 0.3 M (10.9 ± 2.92 vs. controle: 25.9 ± 5.87 ml/210 min) e água (13.4 ± 2.3 vs. controle: 19.9 ± 1.2 ml/210 min). A doença periodontal sozinha não alterou a ingestão de água (8.2 ± 1.5 vs. salina controle: 11.2 ± 1.0 ml/210 min) e NaCl 0.3 M (5.6 ± 1.3 vs. salina controle: 5.7 ± 1.0 ml/210 min).

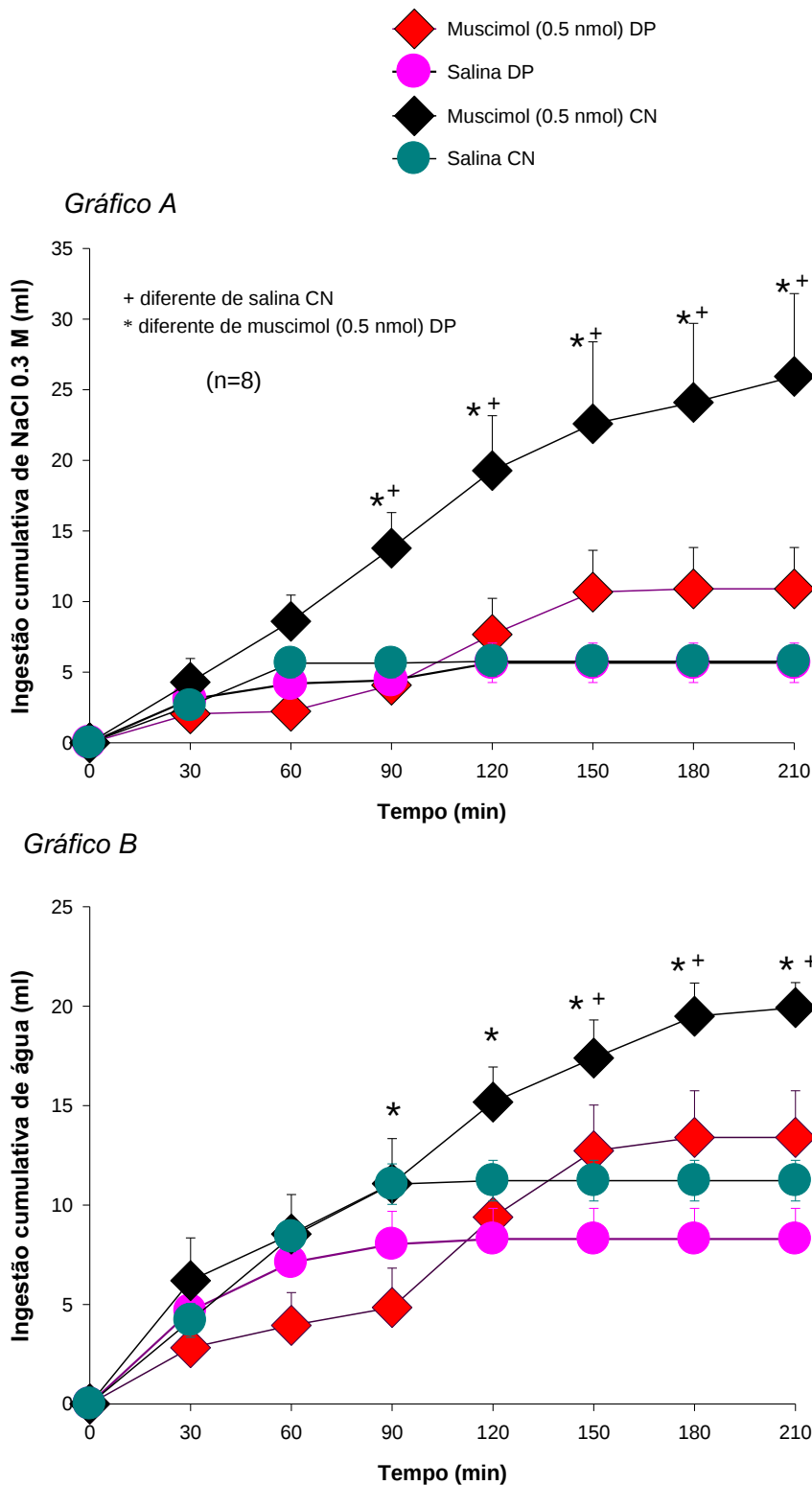


Figura 8. Ingestão cumulativa de NaCl 0.3 M e água em ratos controle (CN) e com doença periodontal (DP) tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) e salina no NPBL. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM, n = número de ratos.

4.6. Efeito de injeções bilaterais de muscimol no NPBL na pressão arterial média e frequência cardíaca.

A figura 9, mostra os resultados de injeções no NPBL de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l, n=5) na pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos saciados controles e com doença periodontal.

Em ratos normotensos controles (PAM: 101 ± 3.4 mmHg e FC: 327 ± 0.9 bpm), injeções bilaterais no NPBL de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l, n=5) promoveram resposta pressora e aumento da FC nos tempos de 30, 90 e 180 minutos (PAM: 13.5 ± 1.5 mmHg e FC: 21.2 ± 2.3 bpm vs. salina: PAM: -0.8 ± 1.2 mmHg e FC: 2.5 ± 1.1 bpm/30 min), (PAM: 18.7 ± 3.0 mmHg e FC: 48.9 ± 6.7 bpm vs. salina: PAM: -0.06 ± 1.4 mmHg e FC: 1.94 ± 2.0 bpm/90 min), (PAM: 15.2 ± 3.3 mmHg e FC: $35.8.9 \pm 6.8$ bpm vs. salina: PAM: 0.6 ± 1.3 mmHg e FC: 4.1 ± 2.0 bpm/180 min).

Em ratos normotensos com doença periodontal (PAM: 103.5 ± 3.1 mmHg e FC: 318.1 ± 7.5 bpm) injeções bilaterais no NPBL de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l, n=5) promoveram resposta pressora nos tempos de 90 e 180 minutos e aumento na FC nos tempos de 30, 90 e 180 min (PAM: 5.3 ± 2.0 mmHg e FC: 60.7 ± 7.0 bpm vs. salina: PAM: -0.2 ± 0.5 mmHg e FC: 2.0 ± 2.9 bpm/30 min), (PAM: 13.2 ± 3.2 mmHg e FC: 72.2 ± 2.9 bpm vs. salina: PAM: -1.8 ± 1.2 mmHg e FC: 2.1 ± 3.7 bpm/90 min), (PAM: 7.5 ± 3.1 mmHg e FC: 27.8 ± 2.6 bpm vs. salina: PAM: -1.7 ± 1.0 mmHg e FC: -1.4 ± 2.6 bpm/180 min).

Podemos observar na figura 9, que a resposta pressora dos ratos com doença periodontal foi significativamente menor nos tempos de 30 (5.3 ± 2.0 vs. controle 13.5 ± 1.5 mmHg) e 180 minutos (7.5 ± 3.1 vs. controle 15.2 ± 3.3 mmHg) quando comparado com ratos controles. Os ratos com doença periodontal apresentaram FC significativamente maior nos tempos de 30 (60.7 ± 7.0 vs. controle 21.2 ± 2.3 bpm) e 90 minutos (72.2 ± 2.9 vs. controle 48.9 ± 6.7 bpm).

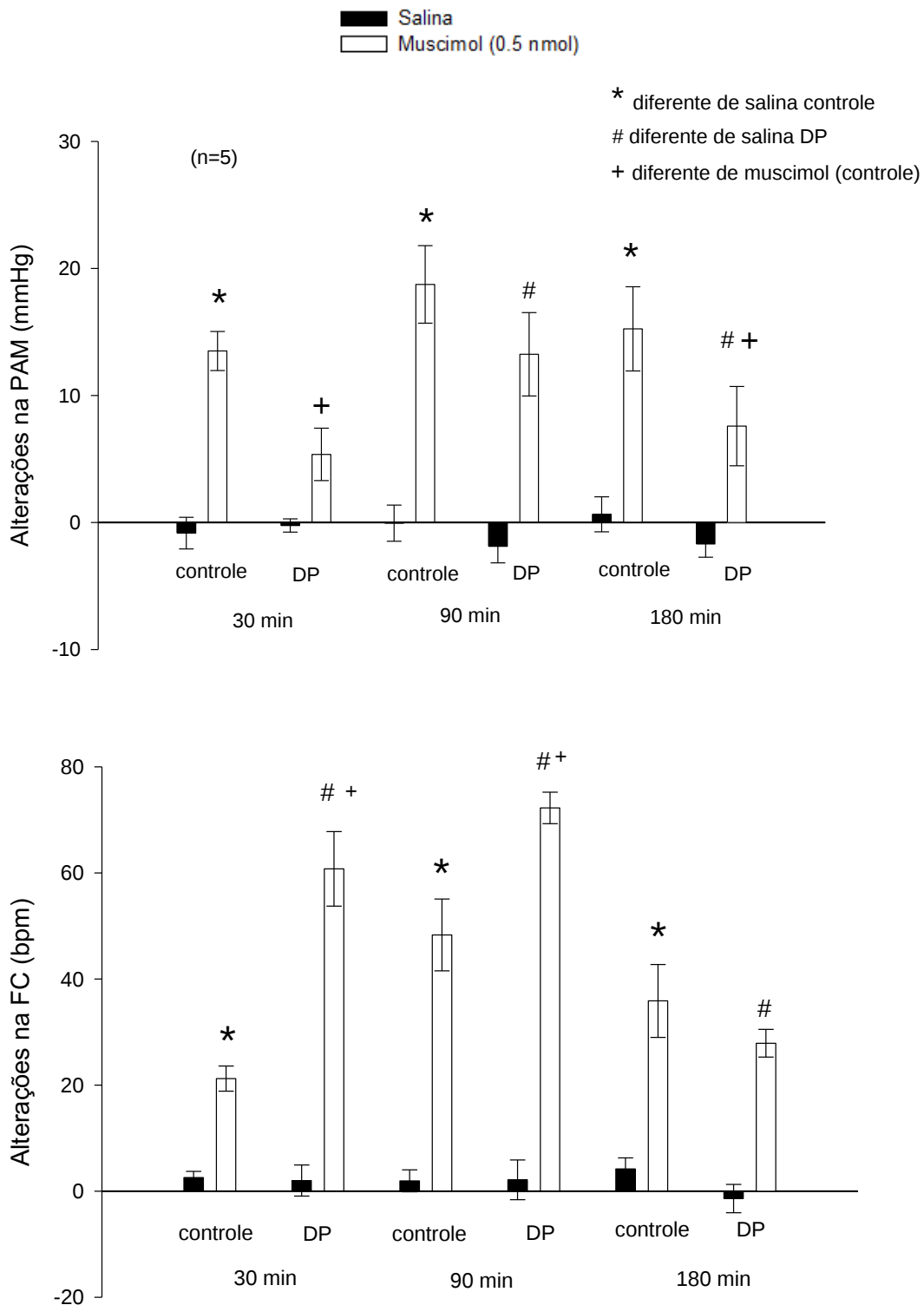


Figura 9. Alterações na pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de ratos saciados controles e com doença periodontal (PD) que receberam injeções de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) ou salina no NPBL. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM; n = número de ratos.

4.7. Níveis plasmáticos de IL-6

A Figura 10 representa os níveis plasmáticos de IL-6. De acordo com os resultados, os níveis plasmáticos de IL-6 foram significativamente maiores no grupo de ratos com doença periodontal (40.4 ± 0.2 pg/ml) quando comparado com o grupo controle (38.8 ± 0.2 pg/ml).

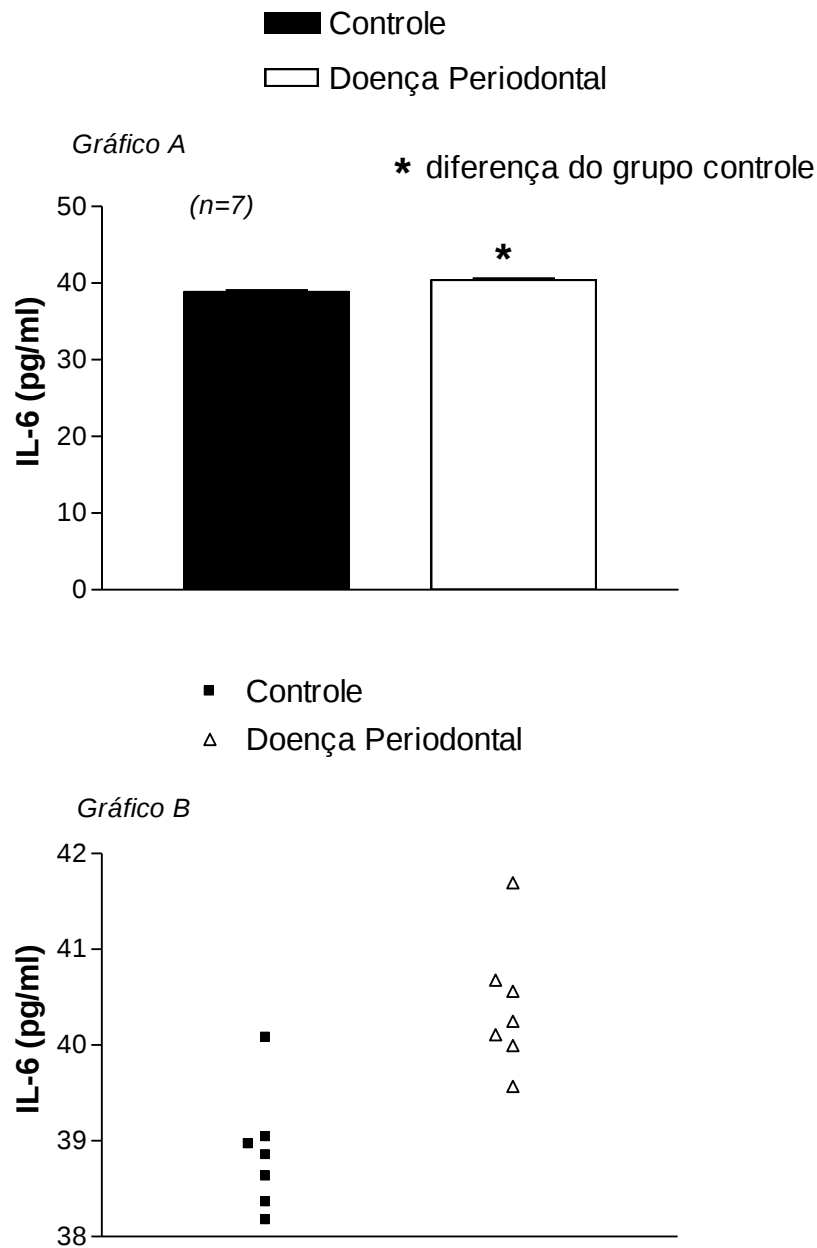


Figura 10. O gráfico A representa os níveis plasmáticos de IL-6 (pg/ml) e o gráfico B representa os níveis plasmáticos individuais de IL-6 (pg/ml) de ratos controles e com doença periodontal. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM; n = número de ratos.

4.8. Níveis plasmáticos de TNF α

A Figura 11 representa os níveis plasmáticos de TNF α . De acordo com os resultados, os níveis plasmáticos de TNF α foram significativamente maiores no grupo de ratos com doença periodontal ($14,58 \pm 1.73$ pg/ml) quando comparado com o grupo controle (3.39 ± 0.33 pg/ml).

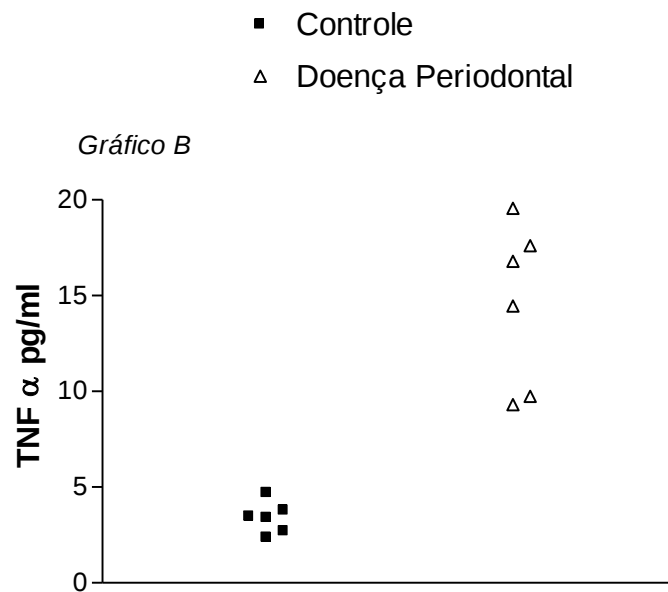
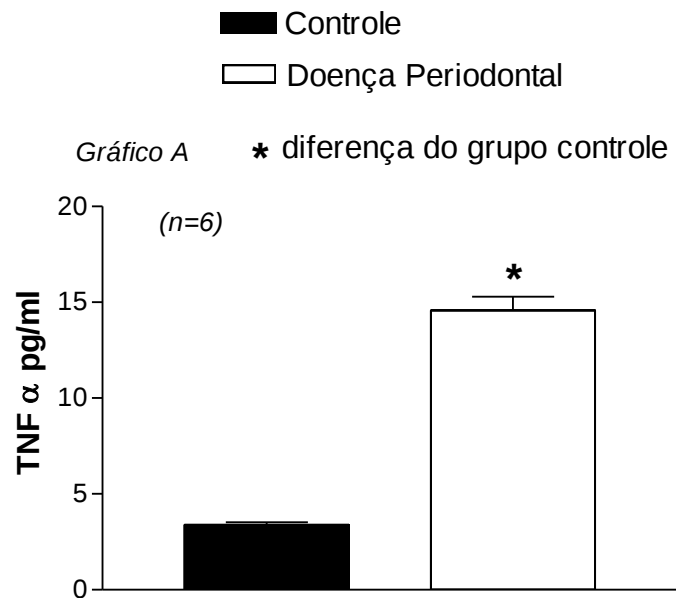


Figura 11. O gráfico A representa os níveis plasmáticos de TNF α (pg/ml) e o gráfico B representa os níveis plasmáticos individuais de TNF α (pg/ml) de ratos controles e com doença periodontal. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM; n = número de ratos.

Discussão

5.0. DISCUSSÃO

Semelhante a estudos anteriores (CALLERA et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2007), o presente estudo mostrou que injeções no NPBL bilateral de muscimol (um agonista de receptor GABA_A), na dose de 0.5 nmol/0.2µl, induziu ingestão de NaCl 0.3 M e água em ratos saciados e aumentou a ingestão de NaCl 0.3 M e água em ratos depletados pelo modelo FURO+CAP. Além do aumento na ingestão de NaCl 0.3 M e água, a mesma dose de muscimol promoveu resposta pressora e aumento da frequência cardíaca em ratos saciados. O envolvimento dos receptores GABA_A no NPBL no efeito natriorexigênico do muscimol foi demonstrado em estudos prévios que mostraram que injeções do antagonista do receptor GABA_A bicuculina, mas não o CGP 35348 (um antagonista de receptor GABA_B) no NPBL bloqueou a ingestão de NaCl hipertônico induzida por muscimol, o que sugere que o muscimol promove ativação de receptores GABA_A no NPBL para induzir ingestão de NaCl hipertônico.

O presente estudo utilizou o modelo de indução da doença periodontal (DP) proposto por Johnson (1975), através do implante de um fio (ligadura) ao redor dos molares de ratos em nível do suco gengival. De acordo com este modelo, a ligadura favorece o acúmulo bacteriano desenvolvendo dessa forma a doença periodontal. A doença periodontal induzida por adaptação de ligaduras e confirmada por análise radiográfica causa perda óssea alveolar, aumento na concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e não promove alterações na ingestão de NaCl hipertônico e água ratos saciados e depletados pelo modelo FURO+CAP, o que sugere que a indução experimental da doença periodontal não inibe ou facilita este comportamento. De outra forma, a doença periodontal induzida por ligadura reduziu a ingestão de água induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e reduziu a ingestão de água e NaCl hipertônico induzido por muscimol em ratos depletados pelo modelo FURO+CAP. A indução da doença

periodontal também reduziu a resposta pressora induzida pelo muscimol injetado no NPBL em ratos saciados.

Na doença periodontal experimental, a ligadura promove retenção de microorganismos na região subgengival. A interação entre os microorganismos que formam a placa bacteriana patogênica e os mecanismos de defesa do hospedeiro resultam na doença periodontal inflamatória (GRAVES et al., 2008). Durante a inflamação periodontal há um considerável aumento de linfócitos e seus componentes no tecido gengival, este aumento de linfócitos possui relação direta com a gravidade da lesão (ALI et al., 2011). A relação entre a infecção bacteriana periodontal e os mediadores do processo inflamatório na perda óssea alveolar está bem estabelecida (ASSUMA, et al., 1998; GRAVES; COCHRAN, 2003). O estágio avançado da doença periodontal desencadeia respostas inflamatórias com ativação de pré-clastos e consequente maturação de osteoclastos, com perda do tecido ósseo e da função do elemento dental (NARES et al., 2009; TAUBMAN et al., 2005). No presente estudo, mostramos que a perda óssea alveolar de ratos com doença periodontal foi significativamente maior que ratos do grupo controle, o que mostra que a adaptação da ligadura foi um método eficaz para a indução da doença periodontal. As citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α estão entre as interleucinas mais frequentes encontradas como promotoras da perda óssea alveolar na doença periodontal (BAKER, et al., 2000; GRAVES, 2008). Além disso, ASSUMA et al., (1998), mostraram que outras citocinas, tais como IL-1 e TNF também estão envolvidas na perda óssea, pois a inibição da IL-1 e do TNF- α promoveu inibição da perda óssea na periodontite experimental. O presente estudo demonstrou um aumento na concentração plasmática de IL-6 e TNF- α e maior perda óssea em ratos com doença periodontal em comparação com ratos controle.

Alterações comportamentais induzidas por processos infecciosos e inflamatórios incluem diminuição da ingestão de alimentos e água após infusão sistêmica de citocinas ou a administração de moléculas que induzem a síntese de

citocinas, [exemplo: lipopolissacarídeos (LPS), fragmento ativo da endotoxina de bactérias gram-negativas] o que é denominado “comportamento de doença” (DANTZER, 2001). Tem sido demonstrado que a administração sistêmica de IL-1 β e TNF- α suprime a ingestão alimentar. Além disso, alguns estudos mostram que injeções centrais de IL-1 β é capaz de inibir todos os tipos de sede (LUZ et al., 2006) e injeções intraperitoneais de IL-1 β inibiu a sede intracelular induzida por NaCl hipertônico (OSAKA et al., 1992). No presente estudo, para monitorar a saúde dos animais foi verificada a ingestão de água e sódio hipertônico (ml/24 hrs) em ratos com 3 e 16 dias após indução da doença periodontal. Observamos, que não houve diferença significativa na ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos com doença periodontal em comparação com o grupo controle em ambos os períodos analisados (3 e 16 dias após indução da DP). Os resultados deste protocolo, mostram que os ratos com doença periodontal possuem boas condições sistêmicas e que a doença periodontal só foi capaz de alterar o efeito pressor, ingestão de sódio hipertônico e água quando os animais receberam as injeções bilaterais de muscimol no NPBL.

O NPBL está envolvido com vários mecanismos homeostáticos, dentre eles a regulação cardiovascular (WARD, 1988; MENANI et al., 1995) e controle do comportamento de ingestão (OHMAN; JHONSON, 1996; KOBASHI et al., 1993). Este núcleo possui conexões com estruturas do tronco cerebral como o núcleo do trato solitário (NTS), área postrema (AP) e bulbo ventro lateral (VLM) (SHAPIRO; MISELIS, 1985; HERBERT et al., 1990) e envia projeções eferentes para áreas anteriores como núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo central da amígdala (CeA) (CIRIELLO et al., 1984; FULWILER; SAPER, 1984; JHAMANDAS et al., 1992; JHAMANDAS et al., 1996). O NPBL possui papel importante na integração das informações ascendentes da AP e mNTS que por sua vez podem possivelmente influenciar a atividade de áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico (MENANI et al., 1996).

Importantes mecanismos inibitórios para o controle da ingestão de água e sódio estão presentes no NPBL. O bloqueio de receptores serotoninérgicos, colecistocinérgicos e glutamatérgicos no NPBL com injeções de metisergida, proglumide e DNQX, respectivamente, aumenta a ingestão de NaCl 0.3 M induzida pelo tratamento com FURO+CAP, mas não em ratos saciados sem nenhum tratamento prévio (MENANI et al., 1996; MENANI; JHONSON, 1998; DE GOBBI et al., 2009). Diferente dos estudos anteriores, o presente estudo mostrou que injeções no NPBL bilateral de agonista GABA_A muscimol induz ingestão de água e NaCl 0.3 M em ratos saciados e também em ratos depletados pelo modelo FURO+CAP. Os resultados sugerem que a desativação de mecanismos inibitórios presentes no NPBL por injeções de muscimol em ratos saciados é suficiente para inibir a saciedade e fazer os ratos ingerirem grande quantidade de NaCl 0.3 M.

Estudos da literatura mostram que neurônios do núcleo parabraquial, especialmente aqueles da porção lateral, podem regular ou modular respostas centrais produzidas pela ativação do sistema imune (ERICSON et al., 1994; ELMQUIST et al., 1996; TKACS; LI, 1999; BULLER; DAY, 2002). O NPBL possui papel fundamental na expressão da proteína C-Fos em neurônios do CeA, BNST e VLM após injeções periféricas de citocinas pró-inflamatórias (BULLER et al., 2004). Além disso, lesão do NPBL promove diminuição significativa da ativação neuronal no CeA após administração sistêmica de IL-1 β , o que sugere que a integridade do NPBL é fundamental para a ativação de neurônios do CeA após estímulo do sistema imunológico (BULLER; DAY, 2002). Outro estudo, combinando métodos de imunohistoquímica e marcação de ativação neuronal, mostrou que uma grande quantidade de neurônios do NPBL são ativados e se projetam para a amígdala após injeções sistêmicas de LPS, sugerindo que projeções NPBL-CeA são importantes para ativação do sistema imunológico (RICHARD et al., 2005).

O CeA também está envolvido no controle da ingestão de água e sódio (COVIAN et al., 1975). Além disso, JIA et al., (2005) mostrou a existência de conexões

GABAérgicas entre o CeA e o NPBL. Recentemente, um estudo mostrou que lesões bilaterais do CeA em ratos saciados, aboliu a ingestão de água e NaCl 0.3 M induzida pela ativação de receptores GABA_A com injeções no NPBL bilateral de muscimol, sugerindo que mecanismos facilitatórios presentes na amígdala são importantes para as respostas dipsogênicas e natriorexigênicas produzidas pela desativação dos mecanismos inibitórios presentes no NPBL pelo muscimol (ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010).

Os mecanismos precisos pelos quais a doença periodontal induzida pela ligadura inibe o efeito pressor, dipsogênico e natriorexigênico do muscimol não estão demonstrados neste estudo. Alguns estudos mostram que citocinas pró-inflamatórias podem modular a neurotransmissão GABAérgica (YU; SHINNICK-GALLAGHER, 1994; WANG et al., 2000; STELLWAGEN et al., 2005; KAWASAKI et al., 2008). A administração de IL-1 β e IL-6 promove redução da frequência de correntes espontâneas pós-sinápticas inibitórias e correntes induzidas por GABA em neurônios da medula espinhal (KAWASAKI et al., 2008) e em neurônios da amígdala (YU; SHINNICK-GALLAGHER, 1994). Além disso, IL-1 β e TNF- α inibiu corrente em receptores GABA em cultura de neurônios do hipocampo, o que resulta em uma diminuição da neurotransmissão sináptica inibitória (WANG et al., 2000; STELLWAGEN et al., 2005).

De acordo com as evidências apresentadas até aqui, sugerimos que os níveis plasmáticos elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α liberados na circulação após a instalação da doença periodontal, podem promover a redução da atividade dos neurônios GABAérgicos localizados no NPBL. Com a menor atividades dos neurônios GABAérgicos, os mecanismos inibitórios presentes no NPBL responsáveis pelo controle da ingestão de água e sódio (mecanismos serotoninérgicos, colecistocinérgicos ou glutamatérgicos) estariam livres da inibição, reduzindo assim, a atividade dos mecanismos facilitatórios presentes no CeA, e

promovendo a redução da resposta pressora, dipsogênica e natriorexigênica do muscimol injetado no NPBL em ratos com doença periodontal.

Não excluimos a possibilidade do envolvimento de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e IL-8 na redução da ingestão de água e NaCl hipertônico induzido pelo muscimol injetado no NPBL de ratos com doença periodontal. Este fato não é improvável, visto os inúmeros mediadores que podem ser liberados na doença periodontal (GRAVES, 2008).

É importante enfatizar que o presente estudo foi o primeiro a analisar os efeitos de um evento inflamatório como a doença periodontal com efeitos cardiovasculares e na ingestão de água e NaCl hipertônico, induzido pela ativação de receptores GABA_A com muscimol no NPBL, estabelecendo assim uma ligação entre mediadores do processo inflamatórios e a neurotransmissão GABAérgica no controle do comportamento de ingestão.

Em conclusão, os presentes resultados sugerem que a ativação do sistema imunológico pela indução experimental da doença periodontal foi capaz de reduzir a resposta pressora e os efeitos dipsogênicos e natriorexigênicos induzidos pela ativação de receptores GABA_A com muscimol injetado no NPBL em ratos saciados e depletados pelo modelo FURO+ CAP, provavelmente por elevar a concentração plasmática de IL-6 e TNF- α . Mais estudos são necessários para esclarecer como a doença periodontal e o processo inflamatório podem afetar a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL, o papel específico das citocinas na neurotransmissão GABAérgica e como estes mecanismos interagem entre si no controle da sede e apetite ao sódio.

Conclusão

6.0 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a ativação do sistema imunológico pela doença periodontal promove redução da resposta pressora e redução dos efeitos dipsogênicos e natriorexigênicos induzidas pela ativação de receptores GABA_A com muscimol no NPBL de ratos saciados e tratados com FURO+CAP, provavelmente por elevar os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF α .

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, N.; HATTORI, K.; OOMURA, Y.; CARPENTER, D.O. Bicuculline and picrotoxinin block γ -aminobutyric acid-gated Cl⁻ conductance by different mechanisms. **Experientia**, n.41,p.70-1, 1985.

ALBANDAR, J.M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: An overview. **Periodontol.**, n. 29, p. 7-10, 2000.

ALI, J.; PRAMOD, K.; TAHIR, M. A.; ANSARI, S. H. Autoimmune responses in periodontal diseases. **Autoimmun Rev.**, n. 10, v. 7, p. 426-431, May. 2011.

AMAR, S.; HAN, X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. **Med. Sci. Monit.**, n. 9, p.291-299, 2003.

ANDRADE, C. A.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR, L. A.; MENANI, J. V. Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, n. 129, v. 1, p. 25-34, 2004.

ANDRADE, C. A.; MARGATHO, L. O.; ANDRADE-FRANZÉ, G. M.; DE LUCA JR, L. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MENANI, J. V. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. **Neuroscience**, n. 19, v. 208, p. 69-78, Apr. 2012.

ANDRADE-FRANZÉ, G. M. F.; ANDRADE, C. A. F.; DE LUCA JR, L. A.; DE PAULA, P. M.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. **Brain Res.**, n. 1332, p. 57-64, 2010.

ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J Immunol.**, n. 160, p. 403-409, 1998.

BAKER, P. J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. **Microbes and Infect.**, n. 2, p. 1181-1192, 2000.

BERKENBOSCH, F.; De GOEIJ, D.E.; REY, A.D.; BESEDOSKY, H.O. Neuroendocrine, sympathetic and metabolic responses induced by interleukin-1. **Neuroendocrinology.**, n. 50, p. 570-576, 1989.

BHATT, S.; ZALCMAN, S.; HASSANAIN, M.; SIEGEL, A. Cytokine modulation of defensive rage behavior in the cat: role of GABAA and interleukin-2 receptors in the medial hypothalamus. **Neuroscience**, n. 133, p. 17-28, 2005.

BLAIR, M. L.; JAWORSKI, R. L.; WANT, A.; PIEKUT, D. T. Parabrachial nucleus modulates cardiovascular responses to blood loss. **Am. J. Physiol.**, n. 280, p. 1141–1148, 2001.

BOWERY, N.G. GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, n.10, p. 401-407, 1989.

BREIVIK, T.; THRANE, P. S.; GJERMO, P.; OPSTAD, P. K.; PABST, R. and VON HORSTEN S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. **J. Periodont. Res.**, n.36, p. 295-300, 2001.

BULLER, K. M.; DAY, T. A. Systemic administration of interleukin-1 activates select populations of central amygdale afferents. **J. Comp. Neurol.**, n. 452, p. 288-296, 2002.

BULLER, K. M.; ALLEN, T.; WILSON, L. D.; MUNRO, W. F.; DAY, T. A. A critical role for the parabrachial nucleus in generating central nervous system responses elicited by a systemic immune challenge. **J Neuroimmunol.**, n. 152, p. 20-32, 2004.

CALLERA, J. C.; DE OLIVEIRA, L. B.; BARBOSA, S. P.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA Jr, L. A.; MENANI, J. V. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 3, n. 134, p. 725-35, 2005.

CHAMBERLIN, N. L.; SAPER, C. B. Topographic organization of cardiovascular responses to electrical and glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, n. 326, 1992.

CIRIELLO, J.; LAWRENCE, D.; PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res.**, n. 322, p. 388-392, 1984.

COLOMBO, N. H.; SHIRAKASHI, D. J.; CHIBA, F. Y.; COUTINHO, M. S. L.; ERVOLINO, E.; GARBIN, C. A. S.; MACHADO, U. F.; SUMIDA, D. H. Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. **J Periodontology**, (2011).

COVIAN, M. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GENTIL, C. G.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; SILVA-NETO, C. R. Central control of salt balance. In: **Neural integration of physiological mechanisms and behaviour**. Toronto: University of Toronto Press, 1975. p. 267-282.

DANTZER R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Ann NY Acad Sci.**, n.933, p. 222–234, 2001.

DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropinreleasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, n. 290, v. 4, p. 1136–1141, 2006.

DE GOBBI, J. I.; DE LUCA, L. A.; MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Res.**, v. 880, n. 1-2, p. 131-8, Oct 2000.

DE GOBBI, J. I. F.; LUCA-JR, L. A.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **Am. J. Physiol.**, n. 280, p. 1301-1307, 2001.

DE GOBBI, J. I.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR, L. A.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Activation of serotonergic 5-HT(1A) receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. **Brain Res.**, n. 1066, v. 1-2, p. 1-9, Dec. 2005.

DE GOBBI, J. I.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, R. F.; MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Res.**, n. 1301, p. 44–51, 2009.

DE LUCA Jr, L. A.; VIVAS, L. M.; MENANI, J. V. **Controle Neuroendócrino da Ingestão de Água e Sal.** Neuroendócrinologia Básica e Aplicada. Rio de Janeiro, 2005.

DE OLIVEIRA, L. B.; CALLERA, J. C.; DE LUCA, L. A.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. **Brain Res Bull.**, v. 4-6, n. 73, p. 238-247, Jul. 2007.

DE OLIVEIRA, L.B.; DE LUCA JR. L.A.; MENANI, J.V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, n. 155, p. 350–358, 2008.

DE OLIVEIRA, L.B.; KIMERA, E.H.; CALLERA, J.C.; DE LUCA, L. A.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V. Baclofen into the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium chloride and sucrose intake in rats. **Neuroscience**, n. 183, p. 160-170, 2011.

DENTON D. **The hunger for salt: an anthropological, physiological and medical analysis.** Berlin. 1984.

DESIMONI, M.G.; IMERI, L. Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. **Bio. Signals Recept.**, n.7, p. 33-44, 1998.

EDWARDS, G.L.; JOHNSON, A. K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am J Physiol.**, n. 261, p. 1039–1044, 1991.

ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; JACOBSON, C. D.; SAPER, C. B. Distribution of fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **J. Comp. Neurol.**, n. 371, p. 85-103, 1996.

EPSTEIN, A. N.; FITZSIMONS, J. T.; ROLLS, B. J. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. **J. Physiol.**, n. 210, p. 457-474, 1970.

ERICSSON, A.; KOVACS, K. J.; SAWCHENKO, P. E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. **J Neurosci.**, n.14, p. 897-913, 1994.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. **Physiol. Rev.**, n. 118, p. 583-686, 1998.

FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 7, n. 3, p. 229-259, 1984.

GRAVES, D. T. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. **Clin Infect Dis.**, n. 28, v. 3, p. 482-90, Mar. 1999.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol.**, n.74, p.391-401, 2003.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol.**, n. 79, p. 1585 – 1591, 2008.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus to the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J. Comp. Neurol.**, n. 293, p. 540-580, 1990.

JHAMANDAS, J. H.; HARRIS, K. H.; PETROV, T.; KRUKOFF, T. L. Characterization of the parabrachial nucleus input to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **J Endocrinol.**, n. 4, p. 461–471, 1992.

JHAMANDAS, J. H.; PETROV, T.; HARRIS, K. H.; VU, T.; KRUKOFF, T. L. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: Electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res. Bull.**, v. 39, n. 2, p. 115-126, 1996.

JIA, H. G.; ZHANG, G. Y.; WAN, Q. A. GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus: an ultrastructural study of anterograde tracing in combination with post-embedding immunocytochemistry in the rat. **Neurosci. Lett.**, n. 382, p. 153–157, 2005.

JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sufhat administration on the periodontium of the rat. **J Periodontal Res.**, n. 10, p. 332-345, 1975.

JOHNSON, A. K.; EDWARDS, G. L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: GANTEN, D. **Current topics in neuroendocrinology, behavioral aspects of neuroendocrinology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. p. 149-190.

KAWASAKI, Y.; ZHANG, L.; CHENG, J. K.; JI, R. R. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **J Neurosci.**, n. 28. p. 5189-5194, 2008.

KIMURA, E. H.; OLIVEIRA, L. B.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA, L. A.; MENANI, J. V.; CALLERA, J. C. Sodium intake by hyperosmotic rats treated with a GABA(A) receptor agonist into the lateral parabrachial nucleus. **Brain Res.**, n. 1190, p. 86-93, jan. 2008.

KOBASHI, M.; ICHIKAWA, H.; SUGIMOTO, T.; ADACHI, A. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci Lett.**, n. 158, p. 47-50, 1993.

KOBASHI, M.; BRADLEY, R. M. Effects of GABA on neurons of the gustatory and visceral zones of the parabrachial nucleus in rats. **Brain Res.**, n. 799, v. 2, p. 323-328, 1998.

KRUFOFF, T. L.; HARRIS, K. H.; JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain. Res. Bull.**, n. 30, p. 163-172, 1993.

LUZ, P. A.; ANDRADE, L.; MIRANDA, N.; PEREIRA, V.; FREGONEZE, J.; DE CASTRO E SILVA, E. Inhibition of water intake by the central administration of IL-1beta in rats: role of the central opioid system. **Neuropeptides**, n. 40, p. 85-94, 2006.

MANAU, C.; ECHEVERRIA, A.; AGUEDA, A.; GUERRERO, A.; ECHEVERRIA, J. J. Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes. **J. Clin. Periodontol.**, n. 35, p. 385- 397, 2008.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms - angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol**, n. 269, v. 5, p. 1044-1049, 1995.

MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol**, n. 270, p. 162-168, 1996.

MENANI, J. V.; COLOMBARI, D. S. A.; BELTZ, T. G.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res.**, n. 801, v. 1-2, p. 29-35, 1998a.

MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am J Physiol.**, n. 274, p. 555-560, feb. 1998b.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol**), n. 275, v. 5, p. 1431-1437, 1998c.

MENEZES, M. F.; BARBOSA, S. P.; DE ANDRADE, C. A.; MENANI, J. V.; DE PAULA, P. M. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res.**, n. 1372, p. 49-58, 2011.

MILLER, L. G.; GALPERN, W. R.; DUNLAP, K.; DINARELLO, C. A.; TURNER, T. J. Interleukin-1 augments γ -aminobutyric acid A receptor function in brain. **Mol. Pharmacol.**, n. 39, p. 105-108, 1991.

NARES, S.; MOUTSOPOULOS, N. M.; ANGELOV, N.; RANGEL, Z. G.; MUNSON P. J.; SINHA, N.; WAHL, S. M.; Rapid myeloid cell transcriptional and proteomic responses to periodontopathogenic *Porphyromonas gingivalis*. **Am J Pathol.**, n. 174, v. 4, p. 1400-1414, Apr. 2009.

NORGREN, R. The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract. In: KATSUKI, Y.; NORGREN, R.; SATO, M. **Brain Mechanisms of Sensation**. New York: Wiley, 1981. p. 143-160.

NORGREN, R. Gustatory system. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 751–771.

OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, n. 25, p. 264–269, 1989.

OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin-ii and isoproterenol. **Am. J. Physiol.**, n. 251, v. 3, p. 504-509, 1986.

OSAKA, T.; KANNAN, H.; KAWANO, S.; UETA, Y.; YAMASHITA, H. Intraperitoneal administration of recombinant human interleukin-1 inhibits osmotic thirst in the rat. **Physiol Behav.**, n. 51, p. 1267-1270, 1992.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 4nd Edition. San Diego: Academic Press, 1997.

PEREIRA, D. T.; VENDRAMINI, R. C.; DAVID, R. B.; NOZAKI, P. N.; MENANI, J. V.; DE LUCA Jr, L. A. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. **Physiol. Behav.**, n. 76, v. 4-5, p. 501-505, 2002.

PRINGLE, A. K.; GARDNER, C. R.; WALKER, R. J. Reduction of cerebellar GABAA responses by interleukin-1 (IL-1) through an indomethacin insensitive mechanism. **Neuropharmacology**, n. 35, p. 147-152, 1996.

RICHARD, S.; ENGBLOM, D.; PAUES, J.; MACKERLOVA, L.; BLOMQVIST, A. Activation of the parabrachio-amygdaloid pathway by immune challenge or spinal

nociceptive input: A quantitative study in the rat using fos immunohistochemistry and retrograde tract tracing. **J Comp Neurol.**, n. 481, p. 210–219, 2005.

SANAVI, F.; LISTGARTEN, M. A.; BOYD, F.; SALLAY, K.; NOWOTNY, A. The colonization and establishment of invading bacteria in periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. **J Periodontol.**, n. 56, p. 273–280, 1985.

SAPER, C. B.; BREDER, C. D. Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. **Prog. Brain Res.**, n. 93, p. 419-428, 1992.

SEYMOUR, G. J.; GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? **Acta Odontol Scand.**, n. 59, p. 167-73, 2001.

SHAPIRO, R. E.; MISELIS, R. R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **J. Comp. Neurol.**, n. 234, p. 344-364, 1985.

STELLWAGEN, D.; BEATTIE, E. C.; SEO, J. Y.; MALENKA, R. C. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . **J Neurosci.**, n. 25, p. 3219-3228, 2005.

TABAREAN, I. V.; KORN, H.; BARTFAI, T. Interleukin-1 β induces hyperpolarization and modulates synaptic inhibition in preoptic and anterior hypothalamic neurons. **Neuroscience**, n. 141, p. 1685-1695, 2006.

TAUBMAN, M. A.; VALVERDE, P.; HAN, X.; KAWAI, T.; Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. **J Periodontol.**, n. 76, p. 2033-2041, 2005.

THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood-pressure, and salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, n. 266, v. 2, p. 458-465, 1994.

TKACS, N. C.; LI, J. Immune stimulation induces Fos expression in brainstem amygdala afferents. **Brain Res Bull.**, n.48, p. 223–231, 1999.

WANG, S.; CHENG, Q.; MALIK, S.; YANG, J. Interleukin-1 β inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor current in cultured hippocampal neurons. **Pharmacol Exp Ther.**, n. 292, p. 497-504, 2000.

WARD, D. G. Stimulation of the parabrachial nuclei with monosodium glutamate increases arterial pressure. **Brain Res.**, n. 462, p. 383–390, 1988.

WENNSTRÖM, O. A.; WENNSTRÖM, J. L.; MERGENHAGEN, S. E.; SIRAGANIAN, R. P. The mechanism of basophil histamine release in patients with periodontal disease, **Clin Exp Immunol.**, n. 33, v. 1, p. 166–173, 1978.

YU, B.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Interleukin-1 β inhibits synaptic transmission and induces membrane hyperpolarization in amygdala neurons. **J Pharmacol Exp Ther.**, n. 271, p. 590-600, 1994.

Anexos



Anexo 1. Radiografias de mandíbulas de ratos controle com histologia positiva para injeções no NPBL.



Anexo 2. Radiografias de mandíbulas de ratos com doença periodontal com histologia positiva para injeções no NPBL.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



*COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto ***"EFEITOS DA INJEÇÃO DE AGONISTA GABAA, NO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NA INGESTÃO DE ÁGUA E NaCl HIPERTÔNICO EM RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL"*** sob responsabilidade da ***Prof. Dr. João Carlos Callera*** de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 000516-2010

Araçatuba, 18 de Fevereiro de 2010

Prof.^a Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP