

DIEGO SANTOS MARTINS

**Análise imunoistoquímica de
neuromediadores nos neurônios do
gânglio trigeminal relacionados com a
inervação da gengiva em ratos**

ARAÇATUBA – SP

2011

DIEGO SANTOS MARTINS

Análise imunoistoquímica de neuromediadores nos neurônios do gânglio trigeminal relacionados com a inervação da gengiva em ratos

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientador: Prof. Dr. Cláudio A. Casatti

ARAÇATUBA – SP
2011

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio A Casatti (Disciplina de Histologia e Embriologia) pela permissão no desenvolvimento deste projeto de pesquisa, inserido no Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), além da colaboração no desenvolvimento de todas as etapas;

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino (Disciplina de Histologia e Embriologia) pela colaboração na execução nos procedimentos cirúrgicos de simpatectomia e perfusão transcardíaca;

Ao Sr. André Mattos Piedade (Disciplina de Histologia e Embriologia) pela eventual colaboração em manter as condições sanitárias adequadas da sala de experimentação animal, Setor de Morfologia do Departamento de Ciências Básicas;

A todos os funcionários e professores da FOA pela dedicação em ensinar e pelo amor à odontologia que me ensinaram a ter.

MARTINS, D. **Análise imunoistoquímica de neuromediadores nos neurônios do gânglio trigeminal relacionados com a inervação da gengiva em ratos.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Resumo

O periodonto apresenta rica inervação sensorial proveniente das divisões mandibular e maxilar do nervo trigêmeo, além de apresentar inervação simpática, cuja função tem sido alvo de estudos recentes. Nesse sentido, a influência do sistema nervoso simpático sobre a evolução do processo inflamatório é conhecida em vários órgãos-alvos, tais como articulações sinoviais, trato digestório, respiratório e urinário. No entanto, uma possível influência da inervação simpática na expressão de neuropeptídeos nos neurônios do gânglio trigeminal que inervam a gengiva de ratos, em particular na gengivite experimental, ainda não tem sido avaliada. E uma vez que as doenças periodontais, representadas principalmente pela gengivite e periodontite, são condições patológicas de origem inflamatória, é de suma importância verificar como a modulação simpática do processo inflamatório pode influenciar a expressão de neuropeptídeos nos neurônios do gânglio trigeminal, envolvidos com o processamento nociceptivo gengival.

Assim, os neurônios sensoriais do gânglio trigeminal que inervam a gengiva do primeiro molar superior esquerdo de rato foram marcados através da deposição de traçador neuronal retrógrado ("true blue"). Os animais foram divididos em três grupos: A) grupo controle, animais com gengiva sadia; B) grupo gengivite, animais com gengivite induzida com carragenina; C) grupo gengivite – simpactectomia, animais com denervação simpática através da remoção cirúrgica do gânglio cervical superior e, gengivite induzida com carragenina.

MARTINS, D. **Immunohistochemical analysis of trigeminal ganglion neurons neuromediators related to rats gums innervation**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Abstract

Periodontium presents a rich sensory innervation from the trigeminal maxillary and mandibular divisions, besides that, it presents sympathetic innervations, which function has been lately studied. In this way, sympathetic nervous system influences on the evolution of inflammation is known in several organs, such as synovial joints, digestive, respiratory and urinary tracts. However, a sympathetic possible influence on the expression of some neuropeptides from the trigeminal ganglion neurons innervating rat's gums, particularly on experimental gingivitis, has not yet been evaluated. And once periodontal illnesses, mainly represented by gingivitis and periodontitis, are pathological conditions of inflammatory origin, it is very important to check how sympathetic modulation on inflammation can influence the expression of some neuropeptides in trigeminal ganglion neurons, involved in gingival nociceptive processing.

For that, sensitive neurons from the trigeminal ganglion that innervates gums of rats upper left first molar has been traced trough deposition of the retrograde neuronal tracer ("true blue"). Animals had been disposed in three groups: A) control group, animals with normal gums; B) gingivitis group, animals with carrageenan induced gingivitis; C) gingivitis – sympathectomy group, animals that passed through sympathetic denervation by the removal of the superior cervical ganglion and gingivitis induced by carrageenan.

Further, twenty days after the deposition of the retrograde neuronal tracer (all the groups) and 48 hours after the gingivitis induction (groups B and

C), all the animals were killed by transcardiac perfusion , the trigeminal ganglion was cryosectioned and subjected to indirect immunofluorescence using for that, antibodies for substance P (SP). The neurons that innervate gums and that had expressed SP immunoreactivity were counted using epifluorescence microscopy and subjected to statistical analysis. The quantitative analysis revealed that the SP expression of the neurons innervating gums with inflammation had a significant rise ($P < 0.05$) in the sympathectomized animals group if compared with the other experimental groups.

The results had shown that intact sympathetic innervations are basic to keep nociceptive neural processing homeostasis mediated by the trigeminal ganglion, during gingivitis evolution.

Keywords:

Periodontium. Sympathetic innervations.

Inflammation. Nociceptive processing.

Sympathectomy. Indirect immunofluorescence.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVO	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4 RESULTADOS	19
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXO I – CERTIFICADO DA CEUA	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inervação do periodonto

O nervo trigêmeo é responsável pela inervação dos tecidos periodontais. A partir das divisões maxilar e mandibular partem ramificações responsáveis pela inervação sensitiva do periodonto, dentre as quais se destacam o ramo alveolar superior (ramo do nervo maxilar) e o ramo alveolar inferior (ramo do nervo mandibular). Esta inervação é responsável em estruturar os receptores de dor (terminações nervosas livres) e mecanoreceptores (terminações nervosas encapsuladas) no periodonto.

Da mesma forma, a presença de inervações simpáticas no periodonto é conhecida, sendo que essa inervação simpática dos dentes deriva do gânglio cervical superior e as fibras nervosas pós-ganglionares são distribuídas paralelamente aos vasos sanguíneos derivados da artéria carótida superior. Observa-se que algumas fibras pós-ganglionares se unem ao nervo trigêmeo, por meio do gânglio trigeminal, e alcançam os dentes e periodonto através das divisões maxilar e mandibular desse nervo (MATTHEWS e ROBINSON, 1980; MARFURT *et al.*, 1986). Apesar da conhecida função do sistema nervoso simpático, em especial na modulação vascular e imunológica, pouco se sabe sobre sua real influência na modulação sensorial. Assim, estudos recentes têm apontado um significativo papel da inervação simpática na modulação do processamento nociceptivo.

1.2 Importância da inervação simpática no processo inflamatório.

A inervação simpática tem importante papel modulador sobre o processo inflamatório, que é um processo complexo, e o sistema nervoso simpático pode influenciá-lo em diversos estágios por vezes com resultados controversos, como obtido em alguns estudos dependendo das condições em que os experimentos são realizados. Segundo Besedovsky *et al.*, os nervos simpáticos e seus neurotransmissores normalmente possuem efeito inibitório sobre o processo inflamatório e a resposta imunológica (BESEDOVSKY *et al.*, 1979; DEL REY *et al.*, 1981; KRUSZEWSKA *et al.*, 1995; DE LUIGI *et al.*, 1998; NAGATOMI *et al.*, 2000). Nesse sentido, a noradrenalina, por exemplo, pode ter ação inibitória ou indutora no processo inflamatório, dependendo de fatores como presença de determinados receptores específicos nas células imunológicas, natureza do agente causador e idade (TIEGS *et al.*, 1999; ELENKOV *et al.*, 2000; SAGIYAMA *et al.*, 2004). Além desses aspectos, outros estudos relatam que a liberação tecidual de noradrenalina afeta a produção e circulação de linfócitos e influencia o processo de reabsorção óssea através da alteração do número de osteoclastos.

1.3 Inervação simpática e as doenças periodontais.

A periodontite e a gengivite são desordens dos tecidos periodontais, frequentemente iniciadas pela presença de micro-organismos que geram a destruição dos tecidos periodontais, incluindo o osso alveolar, na periodontite. Apesar de depender da presença de micro-organismos para se desenvolver, a doença periodontal é grandemente influenciada pela resposta tecidual às bactérias patogênicas e seus produtos, bem como à presença de

células inflamatórias, que pode ser alterada a partir da liberação de certos neurotransmissores pelo sistema nervoso simpático.

Adicionalmente, fatores psicológicos também estão envolvidos no surgimento e desenvolvimento de alterações periodontais. O estresse e seus efeitos são também resultado da produção e liberação de neurotransmissores pelo sistema nervoso simpático, e pode facilitar a colonização de bactérias patogênicas (KIM *et al.*, 2009).

1.4 Neuropeptídeos do gânglio trigeminal

Os neuropeptídeos são mediadores de composição protéica e, diferentemente dos outros neuromediadores são sintetizados apenas nos pericários neuronais, sendo em seguida estocados e distribuídos por todo neurônio, através de vesículas de secreção. Quando este neurônio é estimulado, os neuropeptídeos são secretados para o meio extracelular, onde agem como neurotransmissores ou exercem funções moduladoras (GAŠPERŠIČ *et al.*, 2006).

1.5 Substância P

A substância P (SP) é um oligopeptídeo de 11 aminoácidos classificada como neuropeptídeo que atua através da interação com o receptor NK1, um receptor metabotrópico acoplado a proteína G (GPRC), levando à formação dos segundos mensageiros IP3 (trifosfato de inositol) ou DAG (diacil-glicerol) (MANTYH *et al.*, 1989; PETITET *et al.*, 1991). Este neuropeptídeo é encontrado em grande concentração nos neurônios sensoriais ganglionares (TOHYAMA e TAKATSUJI, 1998).

Dessa forma, a SP tem sido muito estudada por seu envolvimento no processamento de informações nociceptivas e, em gânglios sensitivos, como o gânglio trigeminal, a SP é produzida exclusivamente por neurônios de pequeno diâmetro, associados com fibras do grupo C e A δ (LEHTOSALO et al., 1984; LAWSON et al., 1993). Esse neuropeptídeo pode ser liberado pelas terminações nervosas de fibras no sistema nervoso central, como neuromediador, ou no órgão-alvo onde promove o aumento da permeabilidade venular e, além disso, edema local e vasodilatação arteriolar (HOLZER 1992). Alguns trabalhos mostram que a SP é capaz de estimular a capacidade endocitolítica de macrófagos e neutrófilos.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar se a denervação simpática nos tecidos periodontais era potencialmente capaz de modificar a expressão de um neuropeptídeo nociceptivo, em particular substância P (SP), nos neurônios sensoriais do gânglio trigeminal durante a indução de inflamação gengival no primeiro molar superior de ratos, além de verificar a utilização da carragenina como indutor do processo inflamatório.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados quinze ratos, machos, Wistar adultos-jovens (*Rattus norvegicus*) do Biotério de manutenção do Setor de Morfologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP). Estes animais foram separados em gaiolas, cada uma com cinco animais, alimentados com ração granulada e água *ad libitum* e mantidos sob ciclo de claro/escuro de 12/12 horas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 10\%$ de umidade relativa até o início dos procedimentos experimentais.

Após sofrerem intervenções cirúrgicas, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas nas condições citadas anteriormente. Para os procedimentos experimentais de deposição de traçador neuronal fluorescente "true blue" na gengiva ou indução de gengivite com carragenina, os animais foram previamente anestesiados com injeção intra-muscular de solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios König, Argentina) e xilazina (10 mg/kg, Coopazine, Coopers Brasil, Brasil). E para o sacrifício por perfusão foi empregada solução anestésica de pentobarbital de sódio (i.p.100mg/kg, Cristália, Brasil).

Os procedimentos de manipulação dos ratos seguiram as normas estabelecidas pelo "Canadian Council on Animal Care - Guide to the Care and Use of Experimental Animals", e os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia e Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP - protocolo número 1261/2011 - CEUA).

3.2 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais delineados foram os seguintes:

3.2.1 GRUPO I (controle)

Animais (n=5) que após serem devidamente anestesiados, receberam apenas deposições de “true blue” (10 µl, Sigma, MO, USA) nas regiões mesial, vestibular e lingual da mucosa gengival que circunda o primeiro molar superior esquerdo, e depois de 28 dias foram submetidos à eutanásia (perfusão transcardíaca com fixador histológico, sob anestesia).

3.2.2 GRUPO II (gengivite)

Animais (n=5) que após serem devidamente anestesiados, receberam deposições de “true blue” (10 µl, Sigma, MO, USA) nas regiões mesial, vestibular e lingual da mucosa gengival que circunda o primeiro molar superior esquerdo, 28 dias antes da eutanásia. Além disso, após serem devidamente anestesiados, receberam injeções de solução salina 0,9% acrescida de 5% de carragenina (9 µl, Sigma, MO, USA) nas regiões mesial, vestibular e lingual da mucosa gengival que circunda o primeiro molar superior esquerdo, 2 dias antes da eutanásia (perfusão transcardíaca com fixador histológico, sob anestesia).

3.2.3 GRUPO III (gengivite - simpatectomia)

Animais (n=5) que, após serem devidamente anestesiados, foram submetidos à remoção cirúrgica do gânglio cervical superior esquerdo, 30 dias antes da eutanásia, e receberam deposições de “true blue” (10 µl, Sigma, MO,

USA) nas regiões mesial, vestibular e lingual da mucosa gengival que circunda o primeiro molar superior esquerdo, 28 dias antes da eutanásia. Além disso, também receberam injeções de solução salina 0,9% acrescida de 5% de carragenina (9 μ l) nas regiões mesial, vestibular e lingual da mucosa gengival que circunda o primeiro molar superior esquerdo (Sigma, MO, USA), 2 dias antes da eutanásia (perfusão transcardíaca com fixador histológico, sob anestesia).

Para os procedimentos de injeções de “true blue” e carragenina utilizou-se uma seringa Hamilton (Sigma, MO, USA) com capacidade de 10 μ l, acoplada a uma agulha de anestesia odontológica (30 Gauge, BD, SP, Brasil).

3.2.4 Ganglionectomia

Para o procedimento de ganglionectomia, inicialmente, foi realizada uma incisão parasagital na pele da região infra-hioídea, de aproximadamente de 10 mm de extensão, incluindo também o músculo platisma, com a finalidade de se obter acesso à glândula submandibular, que foi dissecada e rebatida, mantendo-se, contudo a integridade de seu pedículo vásculo-nervoso. Posteriormente a esta manobra a confluência dos músculos esternohioídeo, omohioídeo e esternocleideomastoídeo foi acessada. Com auxílio de um microscópio estereoscópio cirúrgico (MCM5, DF Vasconcellos, SP, Brasil), os músculos foram parcialmente afastados, até a completa visualização da bifurcação da artéria carótida comum. Esta artéria foi tracionada lateralmente, com auxílio de pinça fixada a sua túnica adventícia. A partir de sua exposição, o gânglio cervical superior foi dissecado e removido, através de manobra de divulsão do tecido conjuntivo adjacente e, secção do tronco simpático e de seus ramos comunicantes. Posteriormente, os músculos e a glândula submandibular foram reposicionados e a pele suturada com pontos interrompidos.

Após a eutanásia por perfusão transcardíaca, com fixador histológico, a maxila e o gânglio trigeminal do lado esquerdo foram dissecados e fixados.

3.3 Fixação histológica por perfusão

Os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca no período das 9:00 às 11:00 horas. Para a perfusão transcardíaca, os animais receberam previamente injeção intraventricularmente de heparina (0,1 ml / 5.000 U.I/ml) e após 20 segundos foram perfundidos (bomba peristáltica, Masterflex, CA, USA), via aorta ascendente, com solução salina a 0,9% (100ml), seguido de solução fixadora (500 ml) de paraformaldeído (Sigma Chemical Co., MO, USA) a 2% em tampão fosfato de sódio (PB) (Sigma Chemical Co., MO, USA) a 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. Os gânglios trigeminais e a maxila foram imediatamente dissecados e fixados na mesma solução fixadora durante 120 minutos a 4°C. Em prosseguimento, os gânglios trigeminais foram transferidos para uma solução crioprotetora constituída de tampão fosfato de potássio em salina (Sigma) (KPBS) 0,02 M, pH 7,4, acrescida de 30% de sacarose, durante 12 horas a 4°C, sob agitação.

3.4. Processamento histológico

Cortes histológicos longitudinais do gânglio trigeminal com 20 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de congelação (Jung SMR2000, Leica, Alemanha), coletados em placas de cultura. Os cortes coletados foram mantidos na placa de cultura com solução anti-congelante constituída de 30% de etileno glicol (Sigma), 20% de glicerol (Sigma) em PBS, 0,05 M, pH 7,3 e

estocados a -20°C até serem processados para a técnica de imunofluorescência.

3.5 Método da imunofluorescência indireta

Os cortes histológicos do gânglio trigeminal foram submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm: a) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; b) bloqueio de reações inespecíficas, durante 12 horas, utilizando soro normal de burro (1:33, Sigma), diluído em KPBS 0,02M, pH 7,4 contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma); c) incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com o anticorpo primário policlonal anti-SP de rato (1:5000, AB 153, Chemicom International, CA, USA) obtidos em coelho e diluído em solução contendo 0,3% de triton X-100 (Sigma), soro normal de burro (1:33, Sigma) e KPBS; d) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; g) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotinilado anti-coelho obtido em burro (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 0.3% de triton X-100, soro normal de burro e KPBS; h) duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente; i) incubação por 1 hora, em uma solução estreptavidina-Cy³ (Jackson Immunoresearch, CA, USA), diluído em KPBS, duas lavagens de 10 minutos em KPBS a temperatura ambiente.

Os cortes histológicos foram coletados em lâminas gelatinizadas, desidratadas a temperatura ambiente e montadas com meio de montagem glicerinado e lamínulas de vidro.

3.6 Análise histológica

As lâminas histológicas foram analisadas em microscopia de epifluorescência (Aristoplan, Leica). Os neurônios exibindo fluorescência do “true blue” foram analisados e as imagens coletadas através de uma câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss) com o programa de software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss). Em seguida o filtro de fluorescência foi trocado e os mesmos neurônios foram analisados quanto à imunorreatividade a SP e as imagens coletadas de modo similar.

3.7 Análise estatística

Os neurônios foram quantificados e a porcentagem de neurônios imunorreativos a SP foi obtida para cada grupo experimental, sendo expressa em média \pm erro padrão médio. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância para dados não paramétricos (ANOVA), seguido de pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni, considerando $P < 0.05$, como significante.

4 RESULTADOS

4.1 Análises histológica e estatística

Os neurônios que enviam fibras nervosas para a mucosa gengival foram claramente identificados através da fluorescência azulada emitida a partir do corpo celular (Figuras 1C e 1D), quando analisados no comprimento de onda de 520 nm. Estes neurônios apresentam pequeno diâmetro quando comparados com o diâmetro dos neurônios não marcados (Figuras 1C' e 1D'). Os neurônios que inervam a gengiva estavam localizados na divisão maxilar do gânglio trigeminal, sendo que alguns poucos estavam distribuídos na transição com a divisão mandibular.

Os neurônios imunorreativos a SP foram facilmente identificáveis pela forte fluorescência emitida de seus corpos celulares e do prolongamento axonal proximal (Figuras 1A e 1B). Uma parcela considerável destes neurônios exibiu imunorreatividade a SP no grupo controle ($27\pm 6\%$).

Os animais do grupo com gengivite não mostraram diferença estatisticamente significativa ($30 \pm 2\%$; $P > 0.05$) na porcentagem de neurônios do gânglio trigeminal que exibiram imunorreatividade a SP, quando comparados com o grupo controle (Figura 2). Por outro lado, a porcentagem de neurônios imunorreativos a SP no grupo gengivite e simpatectomizado aumentou significativamente ($44 \pm 4\%$) em comparação com os grupos controle ($P < 0,05$) e gengivite ($P < 0,05$) (Figuras 1C' e 1D'; Figura 2). Estas mesmas avaliações, quando normalizadas a partir do grupo controle, mostraram um aumento mais significativo no grupo gengivite – simpatectomizado quando comparado com os grupos controle ($77 \pm 8\%$) e gengivite ($49 \pm 10\%$) (Figura 2).

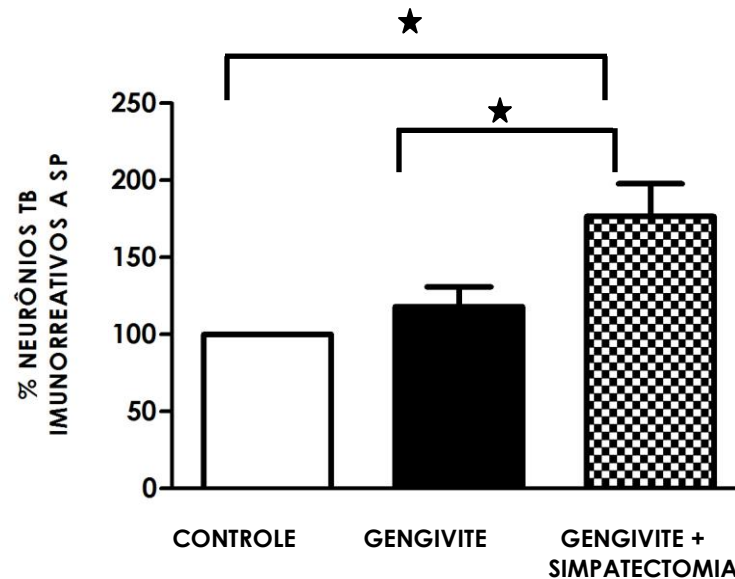


Figura 2. Gráfico mostrando a variação em porcentagem de neurônios que enviam fibras nervosas a gengiva e que exibem imunorreatividade a SP, normalizados a partir do grupo controle. Os dados normalizados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para dados não paramétricos e pós teste de múltipla comparação de Bonferroni, considerando $P < 0,05$ como significante. * $P < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo averiguou a participação da inervação simpática na expressão do neuropeptídeo nociceptivo substância P (SP) no gânglio trigeminal de ratos, submetidos à indução experimental de gengivite no primeiro molar superior esquerdo. Para isso, os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (grupo I), cujos animais receberam apenas deposições do neurotraçador retrógrado "true blue"; grupo gengivite (grupo II), cujos animais receberam deposições do neurotraçador e de carragenina; grupo gengivite-simpatectomia (grupo III), cujos animais foram submetidos à remoção cirúrgica do gânglio cervical superior e posteriormente receberam deposições do neurotraçador e de carragenina. Os resultados foram obtidos a partir da análise de lâminas do gânglio trigeminal submetidas à imunofluorescência indireta.

A substância carragenina foi utilizada como indutor inflamatório no presente estudo. A carragenina é um polissacarídeo linear sulfatado extraído de uma alga marinha, principalmente *Chondrus crispus*, e tem sido utilizada como uma gelatina ou aditivo alimentar como função de estabilizante ou clarificante de bebidas, além de uso medicinal (FAO, 1990). Seu mecanismo de ação é extremamente complexo, e envolve uma série de mediadores, tais como, histamina, serotonina, várias cininas, leucotrienos, prostaglandinas (DI ROSA, *et al.*, 1968; DI ROSA, 1972), além do envolvimento da ciclo-oxigenase induzida (COX-2) (SEIBERT *et al.*, 1994) e óxido nítrico (SALVEMINI *et al.*, 1996). É interessante salientar que esta substância não tinha sido ainda, utilizada em estudos para indução de gengivite em ratos; apesar de ser comumente empregada nos estudos de processos inflamatórios agudos localizados, em locais como a derme, articulações sinoviais, trato respiratórios e urinário

(SCHAIBLE *et al.*, 1990; SCHAIBLE *et al.*, 1994; LUNDBERG *et al.*, 1996). É sabido que a inflamação induzida pela carragenina na pata de ratos atinge o seu pico três horas após sua administração, quando a resposta vascular é máxima e, a migração celular atinge seus maiores níveis. O infiltrado inflamatório nessa fase caracteriza-se pela predominância quase que absoluta de polimorfonucleares neutrófilos (DI ROSA, 1972). Por outro lado, a evolução do processo inflamatório agudo para crônico induzido pela carragenina, difere significativamente da evolução clássica, sendo caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório crônico constituído de células mononucleadas macrofágicas e uma discreta parcela de plasmócitos (DI ROSA, 1972; RHADAKRISHAN *et al.*, 2005; TESSER – VISCAINO *et al.*, 2009).

Sabe-se que a inervação simpática está presente nas estruturas bucais como, por exemplo, na polpa dental e nos periodontos de revestimento e sustentação, e deriva do gânglio cervical superior (ANNEROTH e NORBERG, 1968; POHTO e ANTILA, 1972). Fibras pós-ganglionares simpáticas se unem ao nervo trigeminal em seu gânglio, a partir do qual acessam tais regiões, através dos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmeo. Entretanto, há pouca ênfase na participação do sistema nervoso simpático na inervação das estruturas dentais e periodontais, o que pode ser parcialmente explicado pela pequena proporção de fibras simpáticas nessas estruturas (CHRISTENSEN, 1940; BAUMANN *et al.*, 1976); Feher *et al.* relata que no dente de um adulto, por exemplo, as fibras simpáticas não representam mais que 10% das fibras nervosas totais. Talvez, por isso durante algum tempo considerava-se mínimos os efeitos da inervação simpática sobre estas estruturas dentárias (EDWALL *et al.*, 1985; FRIED *et al.*, 1988; WAKISAKA, 1990; FRIED, 1992). No entanto, experimentos demonstraram que a noradrenalina (um dos principais neurotransmissores simpáticos) exerce importante papel no controle do fluxo sanguíneo intra-pulpar causando diminuição deste fluxo (TÖNDER e NAESS, 1978; EDWALL *et al.*,

1985; KIM, 1985), o que prova que a inervação simpática tem papel vasoconstritor na polpa dentária.

O papel modulador do sistema nervoso simpático sobre o processo inflamatório tem sido bastante estudado e ainda não está completamente elucidado. Neste aspecto, é importante observar a relação entre o sistema nervoso simpático e o sistema imune. Estudos nas últimas décadas têm demonstrado o funcionamento em conjunto do sistema nervoso e do sistema imune, de forma que o sistema nervoso não apenas recebe informações do sistema imune, mas também modula seu funcionamento (ELENKOV *et al.*, 2000). Dessa forma, o sistema nervoso simpático atua como a interface entre o sistema nervoso e o imune. (MADDEN *et al.*, 1995; TADA, 1997; STRAUB *et al.*, 1998; DOWNING e MIYAN, 2000; ELENKOV *et al.*, 2000; BEDOUI *et al.*, 2003).

Por sua vez, a resposta imune é um evento complexo e muitos estudos têm mostrado que o sistema nervoso simpático (SNS) atua sobre ela em diversos estágios. Geralmente o SNS exerce efeito inibitório sobre a resposta imune e inflamatória (BESEDOVSKY *et al.*, 1979; DEL REY *et al.*, 1981; KRUSZEWSKA *et al.*, 1995; DE LUIGI *et al.*, 1998; NAGATOMI *et al.*, 2000), apesar de que em condições experimentais, a noradrenalina pode ter papel pró-inflamatório, dependendo de fatores como a presença de determinados receptores específicos nas células imunes, a natureza do agente infeccioso e a idade do sujeito (TIEGS *et al.*, 1999; ELENKOV *et al.*, 2000; SAGIYAMA *et al.*, 2004). De forma geral, o SNS tem ação antiinflamatória, além de exercer ação moduladora sobre certos parâmetros funcionais dos neurônios sensoriais durante o processo inflamatório e ter importante papel sobre o controle dos mecanismos de homeostase.

No presente trabalho, a influência do SNS foi verificada a partir da comparação da quantidade de neurônios imunorreativos à substância P (SP) em animais simpatectomizados e não-simpatectomizados. Os animais, cujo

gânglio cervical superior esquerdo havia sido removido, mostraram um quadro de inflamação mais acentuada. Foi possível observar macroscopicamente, através de inspeção clínica com microscópio estereoscópico cirúrgico que a margem gengival desses animais apresentava sinais claros de inflamação mais severa quando comparado com o grupo gengivite.

Nos animais simpatectomizados (grupo III), os cortes do gânglio trigeminal apresentaram maior proporção de neurônios imunorreativos a substância P em comparação com os grupos I e II ($p > 0.05$). Isto demonstra que nestes animais (grupo III) o processo inflamatório foi mais exacerbado que nos demais grupos devido à ausência do efeito antiinflamatório da inervação simpática. Processos inflamatórios gengivais induzem um aumento na concentração de SP no fluido crevicular, mostrando que existe uma participação efetiva deste peptídeo nos tecidos gengivais, atuando como um agente da inflamação neurogênica (BARTOLD et al., 1994; LINDEN et al., 1997; HANIOKA et al., 2000; PRADEEP et al., 2009). Possivelmente, há um aumento na liberação de SP nos tecidos gengivais dos ratos simpatectomizados, haja vista o processo inflamatório foi mais severo, como comprovado através da análise comparativa dos cortes histológicos da gengiva dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Um estudo complementar sobre a evolução do processo inflamatório gengival induzido pela carragenina está sendo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, com o intuito de caracterizar seu emprego como indutor de gengivite e periodontite; avaliando suas vantagens e desvantagens em relação aos métodos utilizados atualmente, como fio de sutura entre outros, que resultam em um quadro extremamente agressivo e sem paralelos na clínica odontológica.

6 CONCLUSÕES

A inervação simpática mostrou ser importante em manter a porcentagem de neurônios imunorreativos a SP do gânglio trigeminal que inervam a mucosa gengival durante a indução experimental da gengivite; corroborando com estudos que demonstraram que a inervação simpática atua como um modulador antiinflamatório nos órgãos-alvo de inervação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANNEROTH G, NORBERG K. Adrenergic vasoconstrictor innervation in the human dental pulp. *Acta Odontol Scand*, 26: 89–93, 1968.
2. BAUMANN T, NAIDU K, CHRISTENSEN K. Fluorescence of biogenic monoamines in the human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 41: 531 – 533, 1976.
3. BEDOUI S, KAWAMURA N, STRAUB R, PABST R, YAMAMURA T, VON HORSTEN S. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J Neuroimmunol*, 134: 1–11, 2003.
4. BESEDOVSKY H, DEL REY A, SORKIN E, DA PRADA M, KELLER H. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol*, 48: 346–355, 1979.
5. CHRISTENSEN K. Sympathetic nerve fibers in the alveolar nerves and nerves of the dental pulp. *J Dent Res*, 19: 227–242, 1940.
6. DEL REY H, BESEDOVSKY H, SORKIN E, DA PRADA M, ARREBRECHT S. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system, II. *Cell Immunol*, 63: 329–334, 1981.
7. DE LUIGI A, TERRENI L, SIRONI M, DE SIMONI M. The sympathetic nervous system tonically inhibits peripheral interleukin-1 beta and interleukin-6 induction by central lipopolysaccharide. *Neuroscience*, 83: 1245–1250, 1998.
8. DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *J Pharmacol*, 24: 89-102, 1972.
9. DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The Mechanism of the Inflammatory Effect of Carrageenin. *European J Pharmacol*, 4: 340-342, 1968.
10. DOWNING J, MIYAN J. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol Today*, 21: 281–289, 2000.

11. EDWALL B, GAZELIUS B, FAZEKAS A THEODORSSON-NOHREIM E, LUNDBERG J. Neuropeptide Y (NPY) and sympathetic control of blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat. *Acta Physiol Scand*, 125: 253–264, 1985.
12. ELENKOV I, WILDER R, CHROUSOS G, VIZI E. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 52: 595–638, 2000.
13. FEHER E, CSANYI K, VAJDA J. Ultrastructure and degeneration analysis of the nerve fibers of the tooth pulp in the cat. *Arch Oral Biol*, 22: 699–704, 1977.
14. Food and agriculture organizations of the United Nations (FAO). Training Manual on Gracilaria Culture and Seaweed Processing in China, 1990.
15. FRIED K. Changes in pulpal nerves with aging. *Proc Finn Dent Soc*, 88: 517–528, 1992.
16. FRIED K, ALDSKOGIUS H, HILDEBRAND C. Proportion of unmyelinated axons in rat molar and incisor tooth pulps following neonatal capsaicin treatment and/or sympathectomy. *Brain Res*, 463: 118–123, 1988.
17. GAŠPERŠIČ R, KOVAČIČ U, CÖR A, SKALERIČ U. Identification and neuropeptide content of trigeminal neuron innervating the rat gingivomucosal tissue. *Arch Oral Biol*, 51: 703–709, 2006.
18. HANIOKA T, TAKAYA K, MATSUMORI Y, MATSUSE R, SHIZUKUIISHI S. Relationship of the substance P to indicators of host response in human gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 27:262-266, 2000.
19. HAUG S, HEYERAAS K. Effects of sympathectomy on experimentally induced pulpal inflammation and periapical lesions in rats. *Neuroscience*, 120: 827 – 836, 2003.
20. HAUG S, HEYERAAS K. Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *J Dent Res*, 85: 488–495, 2006.
21. HOLZER, P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanism and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 121:49-146, 1992.

22. KIM S. Regulation of pulpal blood flow. *J Dental Res*, 64: 590–596, 1985.
23. KIM Y, HAMADA N, TAKAHASHI Y, SASAGURI K, TSUKINOKI K, ONOZUKA M, SATO S. Cervical sympatectomy causes alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodont Res*, 44: 695–703, 2009.
24. KRUSZEWSKA B, FELTEN S, MOYNIHAN J. Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice. *J Immunol*, 155: 4613-4620, 1995.
25. LAWSON SN, PERRY MJ, PRABHAKAR E, MCCARTHY PW. Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides and conduction velocity. *Brain Res Bull*, 30: 239-243, 1993.
26. LEHTOSALO JI, UUSILATO H, STJERNSCHANTZ J. PALKAMA A. Substance P-like immunoreactivity in the trigeminal ganglion. *J Histochem*, 80: 421-427, 1984.
27. LINDEN GJ, MCKINNELL J, SHAW C, LUNDY FT. Substance P and neurokinin A in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol*, 24: 799-803, 1997.
28. MARFURT C, ZALESKI E, ADAMS C, WELTHER C. Sympathetic nerve fibers in rat orofacial and cerebral tissues as revealed by the HRP-WGA tracing technique: a light and electron microscopic study. *Brain Res*, 366: 373–378, 1986.
29. LUNDEBERG T, ALSTERGREN P, APPELGREN A, APPELGREN B, CARLESON J, KOPP S, THEODORSSON E. A model for experimentally induced temporomandibular joint arthritis in rats: effects of carrageenan on neuropeptide-like immunoreactivity. *Neuropeptides*, 30: 37-41, 1996.
30. MADDEN K, SANDER V, FELTEN D. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 35: 417–448, 1995.
31. MANTYH P W, GATES T, MANTYH CR, MAGGIO JE. Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J Neurosci*, 9:258-279, 1989.

32. MATTHEWS B, ROBINSON P. The course of post-ganglionic sympathetic fibres distributed with the trigeminal nerve in the cat. *J Physiol*, 303: 391–401, 1980.
33. NAGATOMI R, KAIFU T, OKUTSU M, ZHANG X, KANEMI O, OHMORI H. Modulation of the immune system by the autonomic nervous system and its implication in immunological changes after training. *Exerc Immunol Rev*, 6: 54–74, 2000.
34. PETITET F, BEAUJOUAN JC, SAFFROY M, TORRENS Y, CHASSAING G, LAVIELLE S, BESSEYRE J, GARRET C, CARRUETTE A, GLOWINSKI J. Further demonstration that [Pro9]-substance P is a potent and selective ligand of NK-1 tachykinin receptors. *J Neurochem*, 56: 879-889, 1991.
35. POHTO P, ANTILLA R. Innervation of blood vessels in the dental pulp. *Int Dent J*, 22: 228–239, 1972.
36. PRADEEP AR, RAJ S, ARUNA G, CHOWDHRY S. Gingival crevicular fluid and plasma levels of neuropeptide Substance-P in periodontal health, disease and after nonsurgical therapy. *J Periodontal Res*, 44: 232-237, 2009.
37. RADHAKRISHNAN SA, MOORE C, SLUKA CA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*, 104:567–577, 2003
38. SAGIYAMA K, TSUCHIDA M, KAWAMURA H, WANG S, LI C, BAI X. Age related bias in function of natural killer T cells and granulocytes after stress: reciprocal association of steroid hormones and sympathetic nerves. *Clin Exp Immunol*, 135: 56–63, 2004.
39. SALVEMINI D, WANG ZQ, WYATT PS, BOURDON DM, MARINO MH, MANNING PT, CURRIE MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British J Pharmacol*, 118: 829-838, 1996.
40. SCHAIBLE HG, JARROTT B, HOPE PJ, DUGGAN AW. Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute

- arthritis in the knee joint of the cat: a study with antibody microprobes. *Brain Res*, 529:214-223, 1990.
41. SCHAIBLE HG, FREUDENBERGER U, NEUGEBAUER V, STILLER RU. Intraspinal release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide during development of inflammation in the joint in vivo – a study with antibody microprobes in cat and rat. *Neuroscience*, 62: 1293-1305, 1994.
 42. SEIBERT K, ZHANG Y, LEAHY K, HAUSER S, MASFERRER J, PERKINS W, LEE L, ISAKSON P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role cyclooxygenase 2 in the inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:12013-12017, 1994.
 43. STRAUB R, WESTERMANN J, SCHOLMERICH J, FALK W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol Today*, 19: 409–413, 1998.
 44. TADA T. Immune system as a supersystem. *Ann Ver Immunol*, 15: 1–13, 1997.
 45. TESSER-VISCAÍNO SA, DENADAI-SOUZA A, TEIXEIRA SA, ERVOLINO E, CRUZ-RIZZOLO RJ, COSTA SK, MUSCARÁ MN, CASATTI CA. Putative antinociceptive action of nitric oxide in the caudal part of the spinal trigeminal nucleus during chronic carrageenan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint. *Brain Res*, 1302: 85-96, 2009.
 46. TIEGS G, BANG R, NEUHUBER W. Requirement of peptidergic sensory innervation for disease activity in murine models of immune hepatitis and protection by the beta-adrenergic stimulation. *J Neuroimmunol*, 96: 131 – 143, 1999.
 47. TOHYAMA M, TAKATSUJI K. Atlas of neuroactive substances and their receptor in the rat. 1st edition, Oxford, 1998.
 48. TÖNDER K, NAESS G. Nervous control of blood flow in the dental pulp in dogs. *Acta Physiol Scand*, 104: 13–23, 1978.
 49. WAKISAKA S. Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins, and correlation. *J Endod*, 16:67–69, 1990.

ANEXO I

**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CEUA**