

OSLEI PAES DE ALMEIDA

PROPRIEDADES INFLAMATÓRIAS DA PLACA DENTAL E
DE ALGUNS DE SEUS COMPONENTES

Tese apresentada para o Concurso de Livre-Docência
na Área de Patologia do Departamento de Biologia
e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontolo-
gia de Piracicaba da UNICAMP.

PIRACICABA
1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi realizado com
o auxílio da Fundação de Amparo
à Pesquisa do Estado de São
Paulo (77/662).

Ao Dr. György M. Böhm e ao Dr. Lourenço Bozzo,
responsáveis pela nossa formação científica, os
nossos agradecimentos pela orientação e cons-
tante estímulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Thomas Lehner, ao Dr. Mark Wilton, e aos demais elementos do Departamento de Imunologia e Microbiologia Oral e do Biotério do "Guy's Hospital", Londres, com quem compartilhamos a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, nosso reconhecimento pelo apoio que tem dispensado àqueles que se dedicam ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli e ao Prof. Dr. Luiz Valdrighi que nos têm apoiado desde os nossos primeiros passos na Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Dr. Mário Mariano, à Dra. Tamara Nikitin, e aos colegas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da U.S.P., pela amizade e encorajamento que nos têm dado.

À Sra. Maria Helena de Vasconcellos Peron, ao Sr. Antonio Kerches de Campos e ao Sr. Dirlei Vitti, pela cooperação durante a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários, professores e colegas, do Departamento de Biologia e Patologia Buco-Dental, pela amizade e apoio que nos têm dispensado.

A todos aqueles que colaboraram para a concretização desta tese.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	2
<i>Placa Dental e Doenças Periodontais</i>	3
<i>Permeabilidade do Epitélio Sulcular</i>	7
<i>Participação dos Leucócitos e Imuno-</i> <i>globulinas na Doença Periodontal</i>	8
<i>Lípolissacarídeos e Ácido Lipoteicoico</i>	12
MATERIAL E MÉTODOS	19
<i>Animais</i>	20
<i>Substâncias Usadas</i>	20
<i>Aquecimento e Desacetilação</i>	21
<i>Determinação da Concentração de Proteínas</i>	22
<i>Concentração das Substâncias Usadas</i>	22
<i>Administração das Substâncias e Coleta das Células</i> .	23
<i>Fagocitose</i>	23
<i>Determinação de Complemento, Albumina e</i> <i>Imunoglobulinas no Fluido Peritonal</i>	25
<i>Pré-Tratamento de Camundongos com</i> <i>Lípolissacarídeos</i>	27
<i>Deteção de Anticorpos</i>	27
<i>Células Formadoras de Placas</i>	28
<i>Transferência Passiva de Anticorpos</i>	30

RESULTADOS	31
<i>Dinâmica da Migração de Leucócitos no</i>	
<i>Peritônio de Camundongos</i>	32
<i>Presença de Complemento, Albumina e Imuno-</i>	
<i>globulinas no Fluido Peritoneal</i>	37
<i>Fagocitose</i>	39
<i>Efeito do Pré-Tratamento com LPS na Migração</i>	
<i>de Leucócitos no Peritônio de Camundongos</i>	40
FIGURAS	44
TABELAS	79
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÕES	94
RESUMO	95
SUMMARY	96
ABREVIACÕES USADAS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

INTRODUÇÃO

Os mecanismos de destruição dos tecidos periodontais na doença periodontal inflamatória ainda são desconhecidos, entretanto considera-se que o principal agente etiológico seja a placa dental (Page e Schroeder, 1976; Socransky, 1977; Loesche e Syed, 1978). A evidência mais direta de que a placa dental pode causar destruição periodontal, é o modelo de inflamação gengival humana obtido através do acúmulo natural de placa, e que é totalmente reversível através da higiene oral (LÖe e cols., 1965). Não se sabe qual ou quais componentes da placa dental são os responsáveis pela doença periodontal, e isto em parte é devido a extrema complexidade e variabilidade da placa, cuja estrutura e composição podem ser diferentes nas diversas faces de um mesmo dente. Os principais componentes da placa dental são os microorganismos, mas estes não são comumente encontrados no interior do tecido conjuntivo gengival mesmo em casos avançados da doença (Sussman e cols., 1969). Estas observações levaram a considerar-se os componentes da matriz extracelular desses microorganismos como possíveis agentes etiológicos da doença periodontal, pela capacidade potencial de atravessarem a barreira epitelial. O epitélio sulcular não queratinizado é permeável à albumina, peroxidase, partículas de carvão (McDougall, 1971; Tolo, 1971; Alfano e cols., 1977) e a endotoxinas (Schwartz e cols., 1972). Mergenhagen e cols. (1962, 1963, 1969 e 1976) em uma série de trabalhos verificaram que os lipopolissacarídeos derivados das bactérias orais produzem a reação de Schwartzman, assim como ativação de complemento, reabsorção óssea, e liberação de enzimas dos macrófagos e de polimorfonucleares. Algumas das substâncias da placa também são capazes de provocar transformação blástica e inibição da migração de macrófagos (Ivanyi e Lehner, 1970; Ivanyi e cols., 1972).

Em vista da possível participação dos componentes extracelulares da placa e em particular dos lipopolissacarídeos, na evolução de doença periodontal, este trabalho foi realizado com os objetivos de :

- 1- estudar a capacidade da placa dental e de alguns de seus componentes de provocarem reação inflamatória na cavidade peritoniais de camundongos.

- 2- comparar a reação inflamatória provocada pelo lipopolissacarídeo da *Veillonella alcalescens* em animais normais e previamente imunizados.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

PLACA DENTAL E DOENÇA PERIODONTAL

O tratamento periodontal visa essencialmente a remoção e prevenção do acúmulo de placas nas superfícies dentais, indicando que a placa é considerada como o fator mais importante no desenvolvimento da doença. Outros fatores locais ou sistêmicos podem predispor ou agravar a doença periodontal, mas não são capazes de provocá-la na ausência da placa bacteriana (Page e Schroeder, 1976).

A patogenicidade da placa dental tem sido estudada em diferentes sistemas, através da injeção de extratos de placa na pele ou mucosa (MacDonald e cols., 1963; Rizzo e Mergenhagen, 1964), da transformação blástica de linfócitos (Horton e cols., 1972; Ivanyi e cols., 1972), e através do acúmulo natural de placa nas superfícies dentais, causando inflamação gengival (Attström e Egelberg, 1970 e 1971). O fluido gengival contém componentes do complemento, cujas concentrações estão aumentadas em pacientes com doença periodontal; entretanto, agentes quimiotáticos derivados do complemento ainda não foram identificados neste fluido (Attström e cols., 1975). Ainda não se sabe quais são as substâncias ou bactérias da placa mais diretamente implicadas na lesão periodontal, sendo os resultados até agora obtidos, bastante controvertidos. Os microorganismos mais envolvidos na doença periodontal em geral estão correlacionados com a reabsorção óssea em ratos gnotobióticos e são: *Actinomyces viscosus*; *Actinomyces israelii*; *Actinomyces naeslundii*; *Bacteroides melaninogenicus*; *Bacteroides asacharolyticus*; *Veillonella alcalescens*; e *Eikenella corrodens*. De uma maneira geral os microorganismos Gram-positivos, especialmente os *Actinomyces* parecem estar envolvidos nos casos de evolução lenta, enquanto os Gram-negativos predominam nos

de evolução mais rápida. Entretanto, deve-se ressaltar que os microorganismos da placa não são encontrados nos tecidos periodontais (Freedman e cols., 1968).

Calcula-se que diariamente são formados dez a vinte miligramas de placa, e para o seu desenvolvimento, a placa depende não só da acumulação passiva em áreas mais favoráveis, como de uma aderência seletiva, multiplicação e organização das bactérias. Para exemplificar a aderência seletiva, temos que os *Streptococcus salivarius* contribuem com 41% dos estreptococos facultativos da saliva, e apenas 3,4% nas superfícies dentais (Van Houte e cols., 1970). O *Streptococcus salivarius* tem uma tendência de aderir às células epiteliais, enquanto que o *S. sanguis* adere mais facilmente ao esmalte. Durante o seu desenvolvimento, a placa pode alterar sua estrutura, e numa flora predominantemente Gram-positiva, pode ocorrer um aumento gradativo da população de Gram-negativas e anaeróbicas (LHe e cols., 1965). A localização das bactérias na placa é variável, e Ritz (1969) observou que os *Streptococcus* estão distribuídos por toda placa, enquanto a *Neisseria* se localiza preferencialmente próxima à superfície, e a *Veillonella* nas porções centrais e mais profundas. As principais bactérias cultiváveis da placa são: estreptococos facultativos (27%), difteróides facultativos (23%), difteróides anaeróbicos (18%), peptoestreptococos (13%), veillonella (6%), bacteróides (4%), fusobactéria (4%), neisseria (3%) e vibriões (2%) (Gibbons e cols., 1963). Entretanto, muitos microorganismos da placa ainda não foram identificados.

Recentemente, tem-se tentado associar grupos de bactérias com o desenvolvimento da doença periodontal. Socransky (1977) fez uma revisão do assunto, verificando que uma das bactérias relacionadas com a doença periodontal é o *A. viscosus*. O *A. viscosus* é constantemente isolado da placa dental de pacientes com doença

periodontal (Loesche e Syed, 1978), sendo capaz de provocar a formação de anticorpos e destruição periodontal em animais gnotobióticos (Jordan e cols., 1972; Crawford e cols., 1978). Frações isoladas do *A. viscosus* também são capazes de provocar transformações blásticas em linfócitos de camundongos (Engel e cols., 1977), e de provocarem a liberação de enzimas lisossômicas dos polimorfos nucleares (Taichman e cols., 1978). Além do *A. viscosus*, o *A. naeslundii* também pode causar destruição periodontal (Irving e cols., 1979). De acordo com Loesche e Syed (1978), *A. israeli*, *A. viscosus* e *B. melaninogenicus* estão associados com a gengivite experimental, e segundo Van Palenstein-Helderman (1976), bactérias Gram-negativas, como a *Veillonella* e *Fusobacterium*, predominam em placas "maduras" de pacientes com gengivite. Slots e Hausmann (1979), em um estudo longitudinal, verificaram que *B. Asaccharolyticus* pode iniciar a destruição alveolar em macacos e aderir ao epitélio crevicular.

Os polissacarídeos presentes na placa dental, os glucanos e os levanos são predominantes (Wood, 1967). Estes polissacarídeos, principalmente os glucanos, são fundamentais para a formação e integridade da placa, e seus estudos estão relacionados particularmente com a cárie dental. Os polissacarídeos da placa podem ser encontrados em grânulos no interior das bactérias, na parede das bactérias ou extracelularmente, onde a maior parte é glucano e uma pequena proporção de levano (Wood, 1969). De acordo com McDougall (1964), a placa contém cerca de 1% de levano. Relacionado com a doença periodontal, o trabalho de Ivanyi (1977) indica que o levano pode causar transformação blástica dos linfócitos B, assim como potencializar a estimulação linfoblástica provocada pela *Veillonella*. Os glucanos, polímeros da glucose, são chamados de dextrano quando na cadeia principal há uma predominância de ligações α -1-4, ou mutano quando as ligações são α -1-3 ou α -1-6. De acordo com Hotz e cols., (1972), o mutano α -1-6 serve de

reserva e fonte de energia para a bactéria, enquanto que o α -1-3 é o que predomina na matriz, constituindo 1,35% do peso seco da placa. Até o momento não foi detectada nenhuma α -1-3 glucano-hidrolase na placa, o que explica a estabilidade destes polímeros na placa dental. Com o uso da dextranase não se conseguiu diminuir a formação de placas; entretanto, Kelstrup e cols. (1978), usando a mutanase (α -1-3 glucanohidrolase) em vinte pacientes, conseguiram reduzir a quantidade de placa e gengivite. O dextrano, quando aplicado diretamente sobre a gengiva de cães, provocou uma inflamação observável apenas microscopicamente (Neuman e cols., 1976). O dextrano tem ação mitogênica sobre os linfócitos B, e este efeito é aumentado pela sulfatação (Coutinho e Moller, 1973; Diamantstein e cols., 1973). O dextrano também pode modificar a síntese de anticorpos tanto para os antígenos dependentes como independentes dos linfócitos T (Battisto e Papas, 1973; Alevy e Battisto, 1976). Injetado parenteralmente, o dextrano pode causar um aumento na reabsorção óssea (Hint e Richter, 1958; Johnson, 1975) e endovenosamente, um retardo no aparecimento da hipersensibilidade celular (Ben-David e cols., 1973). O dextrano sulfatado *in vitro* induz a liberação de enzimas lisossômicas de macrófagos de camundongos (Schorlemmer e cols., 1977).

Estes trabalhos mostram que apesar do intensivo estudo da placa dental e de seus componentes, pouco se sabe dos mecanismos de ação destas substâncias no desenvolvimento da doença periodontal. A passagem de componentes solúveis da placa dental para o tecido conjuntivo gengival, através do epitélio sulcular, pode ser um mecanismo importante na evolução das alterações periodontais.

PERMEABILIDADE DO EPITÉLIO SULCULAR

Tem sido demonstrado que substâncias presentes na placa dental podem cruzar o epitélio não queratinizado do sulco gengival, e atingir o conjuntivo subjacente. A passagem através do epitélio do sulco gengival provavelmente é feita através dos espaços intercelulares, indicando que não existe uma barreira contínua de junções, separando o conjuntivo do meio exterior (Gavin, 1968). Através deste epitélio gengival há também um extravazamento de material plasmático e de leucócitos para o sulco gengival, com os vasos próximos à junção dento-gengival apresentando um constante aumento de permeabilidade vascular (Almeida e Böhm, 1979). Antígenos da placa dental foram detectados no tecido gengival, usando-se a técnica da imunofluorescência (Raney, 1978), assim como antígenos do *B. melaninogenicus* e *Fusobacterium* (Courant e Bader, 1966; Takeuchi e cols., 1974). Substâncias como lipopolisacarídeo, dextrano, peroxidase, partículas de carvão e albumina também são capazes de cruzar a barreira epitelial (McDougall, 1971; Tolo, 1971; Schwartz e cols., 1972; Alfano e cols., 1977). A presença de anticorpos parece retardar a penetração de antígenos através da barreira epitelial *in vivo* e *in vitro* (Tolo, 1974; Tolo e cols., 1977) e isto é corroborado pelo fato de que ratos imunizados com *A. viscosus* apresentam uma inflamação menor quando desafiados com substâncias derivadas do mesmo organismo (Guggenheim e Schroeder, 1974).

Esta permeabilidade bidirecional do epitélio sulcular permite que os mecanismos de defesa atuem não só no interior do tecido conjuntivo, como também na própria região do sulco. Os leucócitos estão presentes no conjuntivo subjacente ao epitélio sulcular, e há uma intensa migração de polimorfonucleares para a região do sulco, onde a placa dental está localizada. As imunoglobulinas e frações do complemento também são encontradas no tecido gengival e no fluido sulcular.

PARTICIPAÇÃO DOS LEUCÓCITOS E IMUNOGLOBULINAS NA DOENÇA PERIODONTAL

Uma das características fundamentais da inflamação nos tecidos periodontais é o extravasamento de componentes plasmáticos e de leucócitos, principalmente polimorfonucleares (PMN). A migração de PMN para o sulco gengival é um processo contínuo, e a viabilidade das células aumenta de 81% para 99% quando as células são colhidas seguidamente (Skapski e Lehner, 1976). Os PMN do fluido sulcular são capazes de fagocitar, entretanto o receptor C3b está parcialmente bloqueado, provavelmente por complemento ativado pelo complexo antígeno-anticorpo (Wilton e cols., 1977a e 1977b). A placa dental é capaz de atrair PMN *in vitro* e *in vivo*, e o número de células no fluido gengival aumenta com o processo inflamatório (Attström, 1970; Kraal e Bowles, 1977). A placa dental humana aplicada no sulco gengival de cães e macacos causou um aumento no número de PMN (Hellden e Lindhe, 1973). O complemento ativado também causa um aumento na migração destas células (Kraal e cols., 1977). Embora o complemento seja um dos possíveis fatores envolvidos na migração de PMN, a descomplementação de cães por carragenina ou por cobra *factor* não diminuiu o número de PMN no fluido gengival (Attström e Larson, 1974; Kahnberg e Attström, 1976). Ainda não se sabe qual a participação dos PMN como elementos protetores ou injuriantes dos tecidos periodontais. Existem algumas evidências de que na síndrome de Chediak-Higashi, em que há uma deficiência de migração e fagocitose dos PMN, os pacientes são mais susceptíveis à doença periodontal (Tempel e cols., 1972). Por outro lado, a liberação de enzimas hidrolíticas pelos PMN pode atuar como um fator de agressão (Taichman e cols., 1966). Taichman e McArthur (1976) verificaram que o *A. viscosus* e *A. naeslundii* podem causar liberação de lisozima, β -glucoronidase e catepsina D, mas não de lactato desidrogenase de PMN de coelhos. A

liberação de enzimas é acompanhada pela fagocitose do microorganismo, e no caso do *Streptococcus mutans* depende da presença de dextrano na superfície da bactéria (McArthur e Taichman, 1976). Usando dois tipos de *A. viscosus*, um virulento e outro não, foi verificado que apenas o patogênico causava a liberação de enzimas (Taichman e cols., 1978). Também tem sido descritas correlações entre PMN e Periodontite Juvenil, associadas a um defeito na migração de PMN (Cianciola e cols., 1977). Clark e cols. (1977), compararam a resposta quimiotática de PMN em pacientes com periodontite juvenil; doença periodontal e controles normais. Apenas no grupo com periodontite juvenil, sete de nove pacientes tinham a migração de PMN alterada, o restante tendo migração normal. A alteração parece ser devida a um fator presente nestes pacientes que é capaz de inibir a migração de PMN. Este defeito na migração de PMN foi confirmado por Lavine e cols. (1979) que usaram o C5a como fator quimiotático. Esta doença periodontal difere das outras pela pequena quantidade de PMN no fluido gengival.

Os macrófagos constituem apenas uma pequena porcentagem dos leucócitos no fluido sulcular, estando também presentes no tecido gengival em todos os estágios da doença (Schroeder, 1977; Walker, 1977). Okada e Silverman (1979a e 1979b), verificaram que extratos de gengiva inflamada contêm quimiotaxinogênios para as células mononucleares, o mesmo não ocorrendo com a gengiva normal. A placa dental é capaz de estimular macrófagos de camundongos, fazendo com que sintetizem e liberem enzimas como a glucoronidase e catepsinas (Page e cols., 1973). O LPS pode induzir os linfócitos B a produzirem o fator ativador dos macrófagos (Wilton e cols., 1975); enquanto o fator inibidor da migração de macrófagos (FIM) pode ser formado por linfócitos de pacientes com periodontites, quando estimulados por *V. alcalescens*, *A. viscosus* e *B. melaninogenicus* (Ivanyi e cols., 1972).

Os linfócitos também participam da doença periodontal, e a sua resposta proliferativa à placa e seus componentes foi estudada principalmente por Ivanyi e Lehner (1970). Linfócitos de indivíduos com doença periodontal foram estimulados também por placa de indivíduos normais (Horton e cols., 1972), embora estes resultados não tenham sido confirmados por todos os autores (Kiger e cols., 1974). Por outro lado, Church e Dolby (1978) observaram que a idade do paciente pode ser importante no teste, e está diminuído em pacientes idosos. Smith e Lang (1977) não conseguiram correlacionar o estado clínico com a transformação linfocitária, com exceção do *B. melaninogenicus* em casos de doença avançada e *A. viscosus* e *A. naeslundii* nas menos severas. Segundo Baker e cols. (1976), o *Actinomyces* é o estimulante linfocitário mais potente, e confirmaram a correlação entre severidade da doença e transformação linfocítica. Ivanyi e Lehner (1977a e 1977b), encontraram uma associação entre doença periodontal mat^{er}nal e estimulação de linfócitos de cordão umbilical com componentes da placa.

A participação dos anticorpos na doença periodontal ainda é controversa, apesar da presença de uma grande quantidade de plasmócitos e imunoglobulinas no tecido, e de anticorpos no fluido gengival. Uma das dificuldades para se estabelecer o grau de envolvimento dessas imunoglobulinas na doença, é a variabilidade da especificidade dos anticorpos, e a outra é a falta de uma correlação da doença periodontal e imunoglobulinas contra elementos da placa dental. Assim é que foram encontrados anticorpos contra *Borrelia vincentii*, *F. fusiforme* e *B. melaninogenicus* em indivíduos normais e com gengivites crônica e aguda; não havendo contudo, diferenças nos níveis de anticorpos nos três grupos (Lehner e Clarry, 1966). Isto foi confirmado por Wilton e cols. (1971). Anticorpos contra o LPS do *B. melaninogenicus* foram en-

contrados em todos os soros humanos normais testados (Courant e Gibbons, 1967). Williams e cols. (1976) também detectaram anticorpos contra *Veillonella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Selenomonas* em indivíduos normais e com periodontite, sem diferença entre os dois grupos. Nisengard e cols. (1968) verificaram que indivíduos normais e com periodontite apresentam uma reação de hipersensibilidade imediata contra o *A. naeslundii*; entretanto, a porcentagem é maior no grupo com periodontite. Anticorpos contra *A. viscosus* foram encontrados na mesma quantidade em todas as fases de uma gengivite experimental (Lehner e cols., 1974). Por outro lado, a quantidade de imunoglobulinas no tecido gengival aumenta com a inflamação (Byers e cols., 1975).

Todos estes resultados indicam que os leucócitos e as imunoglobulinas participam como elementos protetores e/ou destrutivos na evolução da doença periodontal. Atualmente os lipopolisacarídeos e o ácido lipoteicoico são considerados como importantes componentes patogênicos da placa dental.

LIPOPOLISSACARÍDIOS E ÁCIDO LIPOTEIcóICO

As bactérias estão agrupadas classicamente em Gram-positivas e negativas, de acordo com a propriedade de se corarem com o corante de Gram. As bactérias Gram-negativas têm na porção externa de sua parede uma macromolécula chamada de endotoxina ou lipopolissacarídio (LPS). Os LPS apresentam uma atividade biológica muito variada, afetando praticamente todos os sistemas do organismo; sendo que a maior parte dos mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos (Ellin e Wolff, 1976). As endotoxinas podem ser liberadas por uma grande variedade de microorganismos, incluindo *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, etc.

O LPS está ligado à parede celular da bactéria na forma de um complexo contendo proteína, lipídio e polissacarídio. Para o isolamento do LPS, pode-se usar a extração com ácido tricloroacético, mistura de água/piridina, ou pela mistura fenol/água a 65-68°C (Westphal e Jann, 1965). Por este último método, quando a mistura é esfriada, a solução que era homogênea separa-se em água (parte superior) e fenol (parte inferior). A endotoxina é encontrada na fase aquosa, juntamente com ácido nucleico. O complexo lipopolissacarídico obtido é formado de 60-85% de polissacarídio e 15-40% de lipídio.

A molécula do lipopolissacarídio pode ser dividida em três partes:

- a) O-polissacarídio
- b) "R-core"
- c) Lipídio A

O O-polissacarídio forma a parte mais externa do LPS, fazendo com que a antigenicidade seja dada por esta molécula, e assim determinando a especificidade sorológica da bactéria. O O-polissacarídio está formado por unidades repetitivas de oligossacarídios contendo de 3 a 6 monossacarídios, que são variáveis de

espécie para espécie (Hellerqvist e cols., 1969).

O "R-core" forma a porção média do LPS, unindo a parte lipídica com o O-polissacarídeo. O conhecimento desta estrutura foi facilitado pelo estudo comparativo de dois tipos de bactérias, uma que forma colônias lisas (S=Smooth) e outra rugosa (R=Rough), que é a mutante da lisa. Durante a mutação S→R, há um bloqueio na síntese das unidades repetitivas do O-polissacarídeo, e portanto a R mutante não tem esta parte da molécula do LPS. A porção mais externa fica sendo o "R-core", e os anticorpos formados são contra esta molécula, não sendo específicos para a espécie e não cruzam com o O-polissacarídeo (Hellerqvist e Lindberg, 1971).

A hidrólise ácida do LPS produz uma fração insolúvel chamada de Lipídeo A, que é a estrutura responsável pela atividade endotóxica do LPS. O lipídeo A é essencialmente formado de ácidos graxos, como o β-hidroxi-mirístico, palmítico, β-mirístico e láurico. O tratamento do LPS com álcali remove os ácidos graxos, alterando assim a estrutura do lipídeo A. Em 1973, Lüderitz e cols. fizeram uma revisão da estrutura e propriedades do lipídeo A.

Uma das características biológicas do LPS, é a capacidade de provocar febre no homem, e em outras espécies sensíveis como o coelho e o cavalo. O mecanismo de ação é desconhecido, mas pode ser indiretamente através dos leucócitos, e foi observado que tanto os polimorfonucleares como os monócitos podem produzir substâncias pirogênicas (Dinarello e cols., 1974). Por outro lado, a repetida administração de LPS pode fazer com que haja um aumento de resistência do animal aos efeitos do LPS, fenômeno este chamado de *tolerância* (Greisman e cols., 1963; Greisman e Woodward, 1970; Greisman e Hornick, 1976). O LPS pode provocar choque vascular em casos de septicemia por bactérias Gram-negativas (Christy, 1971), e atuar no sistema endócrino, especialmente no eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal (Carrol e cols., 1969). A administração de LPS também pode modificar o metabolismo dos carboidratos, lipídios, proteínas e minerais. As endotoxinas apresentam propriedades terapêuticas, como a lise de células neoplásicas, regeneração nervosa e ação fibrinolítica, entretanto seus efeitos colaterais impedem o seu uso clínico (Westphal, 1975).

Além de ser um potente imunógeno (Rossen e cols., 1967), o LPS tem uma ação mitogênica sobre os linfócitos B, que não é mediada por mecanismos imunológicos (Gery e cols., 1972; Peavy e cols., 1973). O LPS também atua como adjuvante, aumentando a quantidade de anticorpos e células formadoras de anticorpos em diversas espécies (Neter, 1969). A reação de Schwartzman que também é característica do LPS, ocorre especialmente em coelhos, quando o LPS é injetado na pele, e depois de 24 horas, endovenosamente, ocorrendo uma lesão hemorrágica no local da injeção inicial, por mecanismo que ainda é desconhecido. Em coelhos, a injeção endovenosa de duas doses de LPS, num intervalo de 24 horas pode causar uma necrose da cortical renal, com diminuição de leucócitos e plaquetas (Horn e Collins, 1968). A administração de LPS altera a resistência a infecções por bactérias, fungos, vírus e parasitas, havendo inicialmente um aumento nas susceptibilidade, seguida por uma maior resistência, que ocorre paralelamente a uma modificação do sistema mononuclear fagocitário (Arredondo e Kampschmidt, 1963; Wright e cols., 1969; Cluff, 1970; Trejo e Di Luzio, 1971).

Alguns dos efeitos do LPS devidos ao lipídio A são: pirogenicidade, toxicidade letal, toxicidade aumentada pela adrenalectomia, reação de Schwartzman, reabsorção óssea, leucopenia, leucocitose, diminuição da pressão sanguínea, transformação blástica dos linfócitos, ativação de macrófagos, ativação de complemento, ativação do plasminogênio e indução de síntese de prostaglandinas.

A injeção endovenosa de LPS no homem, mesmo em doses de 0,1µg, provoca uma leucopenia seguida de leucocitose e uma eosinopenia típica (Athens e cols., 1961). Na cavidade peritoneal há também, inicialmente, uma diminuição no número de células, possivelmente devido a um efeito citotóxico, que é seguido por uma leucocitose. O camundongo C3H/Hej, em contraste com os outros camundongos, apresenta uma grande resistência aos efeitos da endotoxina, incluindo letalidade, mitogenicidade *in vitro* e resposta imune *in vivo* (Watson e Riblet, 1974). Entretanto, os camundongos C3H/Hej apresentam um acúmulo mais rápido e mais intenso de PMN e mononucleares quando o LPS é injetado no peritônio (Moeller e cols., 1978). Desde 1967 foi observado por Keller e Sorkin que os efeitos quimiotáticos de filtrados de *E. coli* dependem em grande parte da ação sobre soro normal. Se a incubação é feita a 0°C, em presença de EDTA ou com soro pré-aquecido a 56°C por 30 minutos, o fator quimiotático não é formado (Snyderman e cols., 1968), indicando sua ação sobre o sistema complemento. As endotoxinas podem ativar o complemento pela via clássica e alternada, e os produtos gerados podem ser responsáveis por algumas das alterações causadas pelo LPS, inclusive a quimiotoxia (Mergenhagen e cols., 1969; Frank e cols., 1973; Fine, 1974). Tanto pela via clássica quanto pela alternada, o fator formado com maior atividade quimiotática é o C5a. Assim, o LPS não produz o fator em camundongos geneticamente deficientes de C5 (Snyderman e cols., 1975), e a quimiotaxia está reduzida em humanos deficientes de C5 (Rosenfeld e cols., 1976). A fração C5a também é formada após o tratamento do soro com o *cobra factor*, e complexos antígeno-anticorpo (Shin e cols., 1969; Gallin e cols., 1975). Além disso, PMN expostos ao C5a desenvolvem irregularidades na superfície e formação de pseudópodos (Gallin e Rosenthal, 1974).

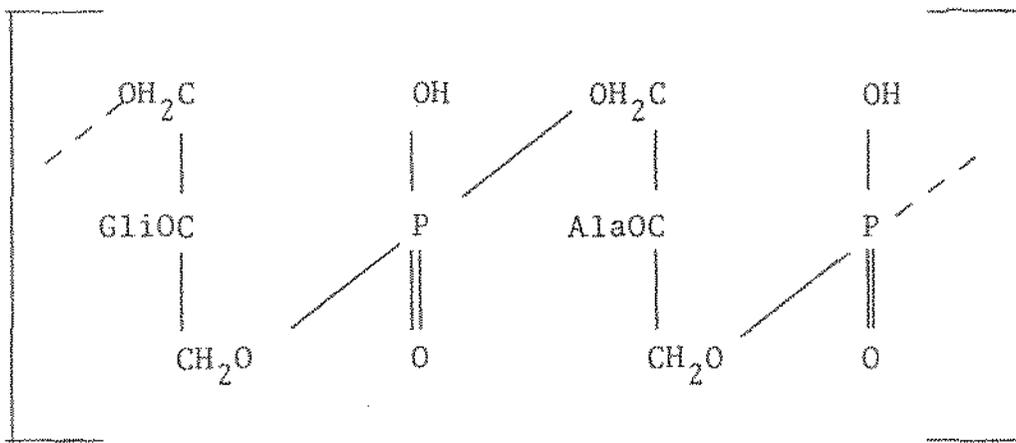
Os LPS também podem agir diretamente nos linfócitos, macrófagos e mastócitos. Os linfócitos B estimulados por LPS produ

zem um fator quimiotático para macrófagos e a ativação de macrófagos pelo LPS, medida pela incorporação de glucosamina C¹⁴, depende da presença de linfócitos B (Wilton e cols., 1975). Macrófagos incubados com LPS são capazes de liberar enzimas lisossômicas (Allison e cols., 1973) e induzir a síntese e liberação de colagenase (Mergenhagen e cols., 1976).

O LPS pode ser obtido de placa, supra e subgengival, e está presente no próprio fluido gengival (Simon e cols., 1970; Shapiro e cols., 1971; Fine e cols., 1978). Endotoxinas têm sido isoladas de bactérias da placa dental, como a *Veillonella*, *Fusobacterium* e *B. melaninogenicus* (Mergenhagen e Varah, 1963; Hofstad, 1968; Kristofferson e Hofstad, 1970; Hofstad, 1978). Os LPS de bactérias orais causam inflamação e reação de Schwartzman na pele de coelho (Rizzo e Mergenhagen, 1964; Sveen, 1977), é capaz de ativar o sistema complemento (Wilton, 1977; Hawley e Falker, 1978), causar reabsorção óssea (Hausmann e cols., 1970), e provocar liberação de colagenase dos macrófagos e de hidrolases de PMN (Schorlemmer e Allison, 1976). O LPS da *F. polymorphum* foi capaz de induzir a migração de PMN na cavidade peritoneal de camundongos, e as células tinham uma capacidade fagocítica aumentada para bactérias orais (Jensen e cols., 1964), enquanto que os LPS da *F. nucleatum* e *V. parvula* também aumentaram a migração e fagocitose de PMN *in vitro* (Baboolal e Powell, 1972). A aplicação de LPS na gengiva de cães foi capaz de provocar aumento de permeabilidade vascular (Ranney e Montgomery, 1973). Simon e cols. (1970) verificaram um aumento de endotoxina em exsudatos gengivais, com o aumento da severidade da inflamação periodontal. Os mecanismos pelos quais o LPS pode causar destruição gengival foram descritos por Snyderman (1972).

Os ácidos teicônicos (o termo vem do grego *teychōs*=parede) são um grupo de polímeros presentes na membrana plasmática e

paredes celulares das bactérias Gram-positivas. O ácido teicóico da parede celular está ligado a um peptídioglicano e em geral tem na cadeia principal o ribitol. O ácido teicóico da parede celular não está presente em todas as espécies, dependendo mesmo do meio de crescimento. O ácido teicóico da membrana plasmática é mais constante, e tem como cadeia principal um polímero do glicerol-fosfato, com ligações fosfodiéstericas 1-3, e contendo 25 a 30 resíduos de glicerol-fosfato. O ácido teicóico da membrana está ligado a uma molécula de glicolipídio, e este complexo foi descrito pela primeira vez por Wicken e Knox (1970) no *Lactobacillus fermenti*, quando usaram o termo lipo-teicóico (LTA).



Ácido Teicóico

Gli = glicosil

Ala = alanil

(Segundo Wicken e Knox)

Em coelhos, a injeção endovenosa de bactérias que contêm ácido teicóico, pode provocar a formação de anticorpos contra esta substância. Quando isolado, o ácido teicóico pode ou não ser um bom imunógeno, dependendo do peso molecular e da presença de proteínas. A imunoglobulina formada é específica para a cadeia principal de glicerofosfato, e não para cada organismo em

particular.. O LTA ao contrário do LPS não é pirogênico, não é letal para camundongos e não estimula a transformação blástica dos linfócitos B. Por outro lado, provoca a reação generalizada de Schwartzman, e sua ação depende da fração lipídica. O LTA é capaz de se ligar às células e à matriz óssea de ossos longos de ratos, e causar reabsorção óssea, entretanto é menos ativo que o LPS (Knox e Wicken, 1973; Wicken e Knox, 1975; O'Grady e cols., 1980). Quando aplicado diretamente no tecido gengival, o LTA provocou inflamação e reabsorção óssea (Bab e cols., 1979).

Os lipopolissacarídeos, o ácido lipoteicoico e outros componentes solúveis da placa dental, podem ser importantes na patogênese da doença periodontal inflamatória, e este trabalho foi realizado para estudar as propriedades inflamatórias de algumas destas substâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Camundongos CD-1 não isogênicos, machos, pesando de 25 a 35 gramas, foram usados em todos os experimentos. Procurou-se usar animais de pesos semelhantes num mesmo experimento, desde que observou-se uma variação no número de células residentes na cavidade peritoneal, de acordo com o tamanho do camundongo.

SUBSTÂNCIAS USADAS

Solução Fisiológica- Solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% isenta de pirogênio.

Dextranos- Dextrano T-250 e T-250 Sulfatado, com peso molecular de 250.000 daltons foram adquiridos da Pharmacia Ltd (Londres, Inglaterra).

Lipopolissacarídeo da *Veillonella alcalescens* (V-LPS)*- Foi preparado de acordo com a técnica do fenol (Westphal e Jann, 1965) a partir de organismos isolados de placa dental humana.

Lipopolissacarídeo da *Salmonella typhimurium* (S-LPS) e da *Escherichia coli* (E-LPS)- O S-LPS e o E-LPS 055:B5 foram obtidos da Difco Laboratories (Detroit, Michigan, Estados Unidos).

Mutanos- O mutano I contendo mais de 99% de ligações α -1-3 e o mutano II com 90% de ligações α -1-3 e 10% de α -1-6 foram preparados a partir do *Streptococcus mutans* M2 176.

*As seguintes substâncias nos foram gentilmente cedidas pelo Dr. J.M.A. Wilton do Departamento de Imunologia e Microbiologia Oral do "Guy's Hospital", Londres: lipopolissacarídeo da *Veillonella alcalescens*, mutano I, mutano II, levano, lipídio A e ácido lipoteicóico.

Levano- O levano derivado do *Corynebacterium levaniiformis* foi preparado de acordo com o método de Moreno e cols.(1976).

Actinomyces viscosus- *A. viscosus*, isolados de placa dental humana, foram cultivados em "caldo de *Actinomyces*" (BBL Baltimore, Estados Unidos) por 48 horas a 37°C. As bactérias foram precipitadas por centrifugação, lavadas em solução fisiológica e resuspensas a uma concentração de 1×10^9 organismos/ml. Após o tratamento com ultra-som por 15 minutos, o sobrenadante foi usado nos experimentos.

Lipídio A- O lipídio A foi preparado por hidrólise ácida a partir do S-LPS, segundo o método descrito por Burton e Carter (1964).

Ácido Lipoteicoico (LTA)- O LTA foi extraído do *Lactobacillus fermenti* (NCTG 6991), pela técnica do fenol, de acordo com Wicken e Knox (1970).

Placa Dental- Foi obtida de pacientes submetidos a profilaxia periodontal, e tanto a placa supra como a subgengival foram colocadas em solução fisiológica. Material obtido de 15 pacientes foi centrifugado por 15 minutos a 3.000rpm, e o precipitado resuspenso em solução fisiológica, foi submetido ao ultra-som por 10 minutos (MSE 60 W). O material foi novamente centrifugado, e o sobrenadante usado nos experimentos. Para o tratamento com ultra-som, foi usado um frasco contendo gelo moído para absorver o calor gerado.

AQUECIMENTO E DESACETILAÇÃO

Para verificar-se o efeito da temperatura nas propriedades inflamatórias da fração obtida da placa dental, do E-LPS e do V-LPS, estas substâncias foram aquecidas a 100°C por 15 minutos. Para a desacetilação, elas foram tratadas com hidróxido de

sódio 0,02N a 37°C por 18 horas, e neutralizadas com ácido clorídrico (Davies e cols., 1958).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas na fração solúvel da placa dental e do *A. viscosus* foi determinada pelo método de Lowry e cols. (1951).

CONCENTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS USADAS

Todas as substâncias foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio a 0,9% isenta de pirogênio. Os mutanos I e II e o levano foram submetidos ao ultra-som por 30 segundos para facilitar a solubilidade. As concentrações das diversas substâncias usadas para o estudo da dinâmica da migração leucocitária na cavidade peritoneal de camundongos foram as seguintes:

Dextrano T-250	100,0ug e 500,0ug
Dextrano T-250 sulfatado	100,0ug e 500,0ug
V-LPS	0,05 ug 0,5ug e 5,0ug
S-LPS	0,5 ug 5,0ug e 50,0ug
Mutano I	5,0 ug 50,0ug e 500,0ug
Mutano II	5,0 ug 50,0ug e 500,0ug
Levano	500,0ug
<i>A. viscosus</i>	5,0 ug 50,0ug e 500,0ug
Lipídio A	0,5 ug e 5,0ug
LTA	0,5 ug 5,0ug e 50,0ug
Placa Dental	2,0 ug 20,0ug e 200,0ug
Placa Dental desacetilada	20,0 ug
Placa Dental aquecida	20,0 ug
V-LPS desacetilado	0,5 ug
E-LPS	5,0 ug
E-LPS desacetilado	5,0 ug

ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS E COLETA DAS CÉLULAS

As substâncias foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos não anestesiados, com o auxílio de uma seringa descartável de 1ml e agulha 25g (Gillete surgical). Os animais controles foram tratados com 0,1ml de solução fisiológica. Este volume foi usado em todos os experimentos, desde que um volume maior provoca uma pequena resposta inflamatória. Para cada concentração das diversas substâncias, nos diferentes tempos, foram utilizados grupos de 4 animais. Após 6, 24, 48 e 72 horas da injeção intraperitoneal, os camundongos foram sacrificados por secção dos vasos do pescoço, e a pele rebatida, expondo-se os músculos abdominais. Com o auxílio de uma seringa e agulha 25G, 5,0ml de solução fisiológica foram injetados no peritônio, e o abdômen massageado delicadamente. Quatro ml foram aspirados com seringa e agulha 21G, e colocados imediatamente em tubos imersos em gelo. A contagem total de leucócitos foi feita usando-se uma câmara de Neubauer, e para a contagem diferencial, preparações feitas com o auxílio de uma citocentrífuga (Shandon, Southern Products, Inglaterra), foram fixadas em metanol puro por 10 minutos e coradas pelo Giemsa. De cada animal, foram preparadas duas lâminas e pelo menos 200 células foram contadas, classificando-se-as em mono e polimorfonucleares.

FAGOCITOSE

Para o estudo do efeito das diversas substâncias na capacidade de fagocitose das células mononucleares do peritônio de camundongo, foi usado um sistema tendo blastosporos de *Candida albicans* (CA) como partículas a serem fagocitadas (Schmid e Brune 1974). Abaixo encontram-se as concentrações das substâncias usadas, sendo que os controles foram tratados intraperitonealmente com 0,1ml de solução fisiológica.

Dextrano T-250	500,0ug
V-LPS	0,5ug
S-LPS	10,0ug
E-LPS	10,0ug
Mutano I	500,0ug
Mutano II	500,0ug
Levano	500,0ug
<i>A. viscosus</i>	50,0ug
Lipídio A	5,0ug
LTA	50,0ug
Placa Dental	20,0ug

Para o preparo das partículas, *Candida albicans* (CA) isoladas de cavidade oral humana foram cultivadas em meio de Sabouraud por 24 horas, e centrifugadas a 3.000 rpm/10 minutos. As partículas precipitadas, depois de lavadas 3 vezes em solução fisiológica foram contadas em câmara de Neubauer, ajustada a uma concentração de 1×10^8 partículas/ml em solução fisiológica e mantidas a 4°C até serem usadas. Para a opsonização, 1×10^8 CA foram incubadas com 0,5ml de soro de camundongo a 37°C por 1 hora, e posteriormente a 4°C por 18 horas. As partículas foram lavadas 3 vezes em solução tamponada de Hanks (Wellcome, Inglaterra), ajustadas a 1×10^8 CA/ml e guardadas a -20°C.

Grupos de 4 camundongos foram injetados intraperitonealmente com 0,1ml das diversas substâncias a serem testadas, sendo que em todos os experimentos houve um grupo de animais controles tratados apenas com solução fisiológica. Depois de 72 horas, os animais foram sacrificados, as células da cavidade peritoneal coletadas em solução de Hanks e colocadas em tubos imersos em gelo. A contagem total e diferencial foi feita como já descrito, e a concentração ajustada a 1×10^6 células /ml em Hanks.

Para o teste da fagocitose, 100 microlitros de Hanks

contendo 1×10^6 células/ml e 10% de soro normal de camundongo, foram colocados sobre a superfície de lâmina especial para fagocitose (Hendley, Multispot Microscope Slides, Inglaterra), e as células deixadas aderir no vidro por 45 minutos a 37°C , em uma câmara úmida. As células não aderentes foram retiradas com Hanks, e as restantes incubadas com 5×10^5 partículas opsonizadas de CA por 45 minutos a 37°C . As partículas não fagocitadas foram removidas, as células fixadas em metanol e coradas pelo Giemsa. Para cada animal, o teste de fagocitose foi feito em duplicata, contando-se 200 células mononucleares, divididas em três grupos: células que não fagocitaram, células contendo 1-3 partículas e células com 4 ou mais CA.

DETERMINAÇÃO DE COMPLEMENTO (C), ALBUMINA E IMUNOGLOBULINAS (Ig) NO FLUIDO PERITONIAL

Para a detecção de C, albumina e Ig no fluido peritonial de camundongos tratados com as diversas substâncias, usou-se a técnica da imunodifusão radial simples (Mancini e cols., 1965). O fluido peritonial foi separado das células inflamatórias por centrifugação, e o material obtido de 4 animais tratados de maneira semelhante foi colocado num único tubo. Para a determinação da albumina, o fluido foi usado nas condições em que foi coletado, enquanto que para o C e para as Ig o material foi primeiramente liofilizado e posteriormente dissolvido em solução fisiológica numa concentração 10 vezes maior que a original. A fração anti-complemento de camundongo (anti C3) foi fornecida pelo Dr. J.M.A. Wilton; a anti-albumina comprada da Miles Laboratories (Estados Unidos) e a anti- γ -globulina obtida do Instituto Behring (Alemanha Ocidental). Os três anti-soros foram preparados em coelhos. Para a construção da curva padrão, foi usado soro normal de camundongo diluído inicialmente a 1:4, para a determinação de

C e Ig e a 1:32 para albumina.

A agarose (Type II, Medium EED, Sigma, St Louis, Estados Unidos) foi dissolvida em tampão veronal pH 8,6 em água fervente, a uma concentração de 1%, e estocada a 4°C. Antes de ser usada, a agarose foi liquefeita e mantida a 56°C. 100 micro litros do anti-soro foram colocados em 5,0ml de agarose, que foram pipetados sobre a superfície de uma lâmina de vidro (7,5x5,0 cm), de maneira a formar uma camada homogênea. Em 12 círculos de 3mm de diâmetro, foram colocados 5,0ul do fluido a ser testado; em 4 círculos, o soro controle em diferentes concentrações. Para a difusão e precipitação das Ig, a lâmina foi colocada numa câmara úmida a 4°C. Depois de 24 horas, a agarose foi coberta com papel de filtro endurecido (Watman Ltd, Inglaterra), umedecido em solução fisiológica a 56°C. Depois de lavada por duas horas, a lâmina foi corada com Azul de Comassie por 15 minutos a 56°C, e diferenciada com uma solução de ácido acético.

Solução Corante

Azul de Comassie	1g
Ácido Acético	42,5ml
Etanol	135ml
Água Destilada	500ml

Solução Diferenciadora

Ácido Acético	200ml
Etanol	625ml
Água Destilada	1625ml

O quadrado do diâmetro da zona de precipitação foi medido, e o resultado expresso em porcentagem, levando-se em consideração a curva padrão feita a partir de soro normal de camundongo.

PRÉ-TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM LIPOPOLISACARÍDIOS

Grupos de 4 animais foram pré-tratados com 10,0ug de V-LPS, E-LPS ou S-LPS intraperitonealmente ou endovenosamente através da veia caudal. Os animais controles receberam a mesma quantidade de solução fisiológica. Depois de 7 dias, o mesmo LPS usado no pré-tratamento foi injetado no peritônio (V-LPS 0,5ug, E-LPS e S-LPS 5,0ug) e após 24 horas, o fluido peritoneal foi coletado e a contagem total e diferencial feita como descrito anteriormente. Grupos de 4 camundongos pré-tratados endovenosamente com os mesmos lipopolisacarídeos, foram injetados intraperitonealmente com 50,0ug de *A. viscosus*. Dois grupos de camundongos foram pré-tratados com 10,0ug de V-LPS intraperitonealmente, e passados vinte dias, um grupo foi injetado com 0,5ug de V-LPS e o outro com 5,0ug de E-LPS na cavidade peritoneal.

DETECÇÃO DE ANTICORPOS

A detecção de anticorpos no soro e no fluido peritoneal de animais normais e pré-tratados com lipopolisacarídeos foi feita através da técnica da hemaglutinação passiva, como descrita por Davies e cols. (1958). Para o preparo do soro, o sangue foi deixado coagular por 1 hora a 37°C, e depois de separado das paredes do frasco foi mantido a 4°C por 24 horas. O sobrenadante foi retirado, centrifugado a 3.000rpm/10 minutos e mantido a -20°C até ser usado. O fluido peritoneal foi coletado como descrito anteriormente, liofilizado e solubilizado em solução fisiológica a uma concentração 10 vezes maior que a original. Eritrócitos de carneiro, obtidos de sangue defibrinado, foram sensibilizados com LPS de acordo com Davies e cols. (1958). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes, e após a última centrifugação, 0,5ml de células foram suspensas em 10,0ml de tampão fosfato pH 6,4. 0,5ml de células e 0,5ml de LPS (V-LPS 0,5mg/ml, E-LPS e S-LPS 1mg/ml) foram

incubados a 37°C por 1 hora em um dispositivo rotatório, que manteve uma agitação constante. As células foram então lavadas 4 vezes em tampão fosfato pH 7,2, e resuspensas em 2ml do mesmo tampão. Os eritrócitos controles foram preparados nas mesmas condições; apenas na incubação não foi usado LPS.

O soro e o fluido peritonial foram descomplementados a 56°C por 1 hora, e absorvidos com eritrócitos normais de carneiros. Para a absorção, volumes iguais de soro e eritrócitos foram deixados por 30 minutos à temperatura ambiente, e após a centrifugação (3.000rpm/5 minutos) o sobrenadante foi retirado. Os soros usados como controles positivos foram obtidos de coelhos hiperimunizados com as respectivas substâncias. Todos os recipientes da placa usada para a titulação (Microtiter System, Sterelin, Inglaterra) receberam inicialmente 50,0ul de tampão fosfato pH 7,2, contendo 1% de albumina bovina. O soro e o fluido foram diluídos com o auxílio de uma alça (Titertek, Flow Laboratories) que fazia a transferência de 50,0ul, e portanto dando uma diluição de 50% em cada passagem. Na última coluna foi deixado apenas o tampão, para se observar a hemaglutinação espontânea das hemácias. Cada soro ou fluido foi testado com eritrócitos controles e sensibilizados. As placas do microteste foram deixadas à temperatura ambiente por 24 horas, e os resultados expressos levando-se em consideração a última diluição com hemaglutinação positiva.

CÉLULAS FORMADORAS DE PLACAS

Para a detecção de células formadoras de placas foi usado o método de Cunningham e Szenberg (1968). Os animais foram imunizados com duas injeções endovenosas, 10,0ug cada uma, de V-LPS, E-LPS ou S-LPS, sendo a segunda ministrada 3 semanas após a primeira, e os animais sacrificados depois de 3 dias.

Para o preparo das células, o baço dos animais foi retirado e colocado em meio de cultura 199 contendo penicilina, estreptomicina (Wellcome, Inglaterra) e 5% de soro fetal de vitela inativado (FCS, Gibco, Escócia). O tecido foi cortado em pequenos pedaços em placa de Petri, passado através de uma rede metálica com o auxílio do êmbolo de uma seringa de 20ml e, por turbulência, usando-se uma agulha 21G, transferido a um tubo plástico. Depois de 30 minutos no gelo, para permitir a precipitação dos aglomerados, o sobrenadante foi centrifugado a 1.000rpm/10 minutos. O precipitado foi resuspenso em 1ml de meio de cultura, o número de células viáveis determinado através da exclusão de Azul de Tripán, e a concentração ajustada a 1×10^7 células vivas por ml.

Os eritrócitos de carneiro foram sensibilizados como descrito para a hemaglutinação, e a concentração final usada foi de 20%. O complemento foi preparado de sangue de cobaia, congelado apenas uma vez, e diluído 1:1 em meio de cultura 199.

As câmaras usadas no teste foram feitas por meio de 2 lâminas de vidro justapostas e divididas ao meio através de uma fita adesiva dupla. Os testes, inclusive os controles, foram feitos em triplicatas. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, em cada câmara foram colocados:

0,1 ml do meio de cultura 199

0,1 ml de células esplênicas (1×10^6 células)

0,025ml de eritrócitos sensibilizados ou controles

0,025ml de complemento

A câmara foi selada com parafina aquecida contendo 30% de vaselina e incubada por 1 hora a 37°C. As placas formadas foram contadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico, e o resultado expresso em número de placas presentes em 1×10^7 células esplênicas.

TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ANTICORPOS

Soro contendo imunoglobulinas específicas para S-LPS (título de 1:4086), foi preparado do sangue de camundongos imunizados, com 2 injeções endovenosas (10,0ug cada uma) do lipopolissacarídeo. 200 microlitros deste soro foram transferidos endovenosamente em camundongos recipientes, num total de 4 animais. Os controles receberam tratamento semelhante, apenas que o soro transferido não continha anticorpos contra S-LPS. 30 minutos após a transferência, todos os animais receberam 5,0ug de S-LPS intraperitonalmente, e foram sacrificados após 24 horas. A dosagem de anticorpos foi feita no soro 30 minutos e 24 horas após a transferência passiva do anticorpo, e no fluido peritonal apenas depois do sacrifício dos animais.

RESULTADOS

RESULTADOS

DINÂMICA DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO PERITÔNIO DE CAMUNDONGOS

As células presentes na cavidade peritoneal de camundongos normais são em sua grande maioria mononucleares, com uma pequena proporção de polimorfonucleares (PMN). A injeção de 0,1ml de solução fisiológica no peritônio, praticamente não causa modificação na população celular, que permanece em torno de $4,4 \times 10^6$ células por animal (Fig. 1). Entretanto se o volume injetado for maior que 0,1ml, ocorre um discreto aumento do número de PMN que pode interferir com os resultados. Os animais foram mortos por secção dos vasos do pescoço, visto que se não for feita a exsanguinação, muito frequentemente há o aparecimento de sangue na cavidade peritoneal, devido às manipulações usadas para a coleta das células.

O dextrano T-250 nas doses de 100,0 e 500,0ug não modificou o número total de células, nem alterou a proporção de mononucleares e PMN. A sulfatação do dextrano não aumentou o número de células, provocando uma elevação mínima no número de PMN, que atingiu um máximo de $1,1 \times 10^6$ células 24 horas após a administração (Tab. 1).

Das substâncias testadas, o lipopolissacarídeo da *Veillonella alcalescens* (V-LPS) foi a mais potente, provocando uma resposta inflamatória dependente da dose usada (Fig. 2). A dose de 0,05ug por camundongo causou um pequeno aumento no número de células, atingindo $7,1 \times 10^6$ células nas primeiras 6 horas. O aumento foi devido principalmente a PMN. Decorridas 6 horas após a administração de 0,5 e 5,0ug, houve um aumento do número de células, semelhante ao causado por 0,05ug. Entretanto, após 24 ho

ras, com 0,5ug o total de células foi de $18,7 \times 10^6$ e este número atingiu $25,1 \times 10^6$ com 5,0ug. O total de células caiu nas próximas 24 horas, mas ainda apresentava $14,2 \times 10^6$ com 0,5ug e $16,8 \times 10^6$, depois de 72 horas. Com as 3 doses usadas, o aumento nas primeiras 6 horas foi devido exclusivamente a PMN, enquanto que as mononucleares permaneceram em níveis normais. O aumento brusco que ocorreu após 24 horas também foi devido, em sua maior parte, aos PMN que constituíram cerca de 70% do total das células com a dose de 5,0ug. Mesmo após 72 horas os PMN constituíam 20% das células e estavam acima dos níveis normais. As mononucleares estavam aumentadas depois de 24 horas, e com as doses de 0,5 e 5,0ug continuaram a aumentar até 72 horas, atingindo $15,2 \times 10^6$ e constituindo cerca de 80% das células. Desta maneira, o V-LPS causou um acúmulo máximo de mononucleares após 72 horas.

A desacetilação de 0,5ug de V-LPS reduziu sua capacidade de causar um acúmulo de mononucleares depois de 24 horas, baixando de $6,8 \times 10^6$ para $3,9 \times 10^6$ células, e de PMN de 8,05 para $0,4 \times 10^6$ células (Tab. 2). O mesmo tratamento teve efeito semelhante no E-LPS. Uma concentração de 5,0ug foi capaz de atrair $7,1 \times 10^6$ PMN depois de 24 horas, e este número foi reduzido a $1,0 \times 10^6$ após a desacetilação do E-LPS (Tab. 2). Desta maneira, o tratamento com hidróxido de sódio aboliu a capacidade destes LPS de elicitar uma migração leucocitária no peritônio.

O lipídio A utilizado induziu com uma dose de 5,0ug, a presença de $3,76 \times 10^6$ PMN após 6 horas, que aumentou para $4,63 \times 10^6$ depois de 24 horas, decrescendo posteriormente até 72 horas. Com 0,5ug o número máximo de PMN foi também após 24 horas, atingindo $1,6 \times 10^6$ células. O lipídio A, nestas duas doses usadas, provocou considerável aumento de mononucleares, o qual persistiu até 72 ho

ras, atingindo valores duas vezes maior que os encontrados em peritônio normal (Fig. 3). Assim sendo, o lipídio A foi ativo não só para PMN mas principalmente para mononucleares.

Ao contrário do V-LPS, o S-LPS apresentou uma capacidade muito pequena de atrair PMN (Fig. 4), atingindo um valor máximo de $2,5 \times 10^6$ PMN após 48 horas, ocorrendo posteriormente um decréscimo. O aumento de mononucleares ocorreu de maneira crescente após 24 horas, com as doses de 0,5 e 5,0ug, atingindo valores semelhantes após 72 horas. Com 50,0ug houve uma diminuição acentuada de mononucleares a partir das 6 horas, atingindo $1,1 \times 10^6$ células após 24 horas, aumentando lentamente nas horas subsequentes, permanecendo ainda abaixo dos valores normais após 72 horas, $2,9 \times 10^6$ células. Com 50,0ug, o S-LPS mostrou-se bastante tóxico, com animais apresentando pelos eriçados, e perdendo a vivacidade característica dos camundongos.

O mutano I, contendo mais de 99% de ligações α -1-3, a uma concentração de 5,0ug causou um pequeno aumento de PMN nas primeiras 6 horas ($1,36 \times 10^6$), voltando aos valores normais após 72 horas (Fig. 5). Depois de 48 horas o aumento no número total de leucócitos foi devido quase que exclusivamente aos mononucleares. Com 50,0ug o total de células foi menor que com 5,0ug, e isto porque houve uma diminuição de mononucleares nas primeiras 24 horas. Com esta dose, o aumento de PMN nas primeiras 24 horas foi paralelo à diminuição de mononucleares. Com 500,0ug, após 6 horas o total de células atingiu $8,86 \times 10^6$, e isto foi devido aos PMN, com diminuição na quantidade de mononucleares. Após 24 horas o total aumentou ainda mais, atingindo $12,1 \times 10^6$, e apesar da maioria das células serem PMN, houve um aumento também de mononucleares. Os PMN diminuíram nas horas subsequentes chegando a $2,98 \times 10^6$ após 72 horas, enquanto as mononucleares continuaram a aumentar chegando a $8,12 \times 10^6$ depois de 72 horas.

O mutano II apresentou uma atividade bem menor que o mutano I, especialmente na concentração de 500,0ug (Fig. 6). Com 5,0 e 50,0ug o número de PMN foi bastante reduzido durante todo o experimento, não atingindo 1×10^6 células. Nas mononucleares houve um decréscimo após 6 horas com 50,0ug, que voltou rapidamente a níveis normais, enquanto que com 5,0ug houve um aumento após 24 horas, que persistiu até 72 horas. Com 500,0ug o mutano II provocou um decréscimo inicial no total de leucócitos, pela diminuição de mononucleares que chegou a $1,71 \times 10^6$ e que não foi compensada pela migração de PMN. Após 24 horas, as mononucleares começaram a aproximar-se dos valores iniciais, enquanto que os PMN aumentaram pouco. Depois de 48 horas o número de mononucleares e PMN atingiu o máximo, dando um total de $7,81 \times 10^6$ células.

O levano, mesmo a uma dose de 500,0ug, provocou apenas um pequeno aumento de PMN após 6 horas que chegou a $1,6 \times 10^6$ (Fig. 7). Apesar do aumento de PMN, o total de leucócitos teve um pequeno decréscimo, devido aos valores baixos de mononucleares, $1,9 \times 10^6$. Após 24 horas tanto o total como as mononucleares voltaram a níveis normais, enquanto que os PMN começaram a desaparecer.

O *A. viscosus* causou um aumento no número total de células que foi dependente da dose usada, e que se iniciou após 6 horas (Fig. 8). Este aumento foi devido principalmente aos PMN que com a dose de 50,0ug chegaram a $4,0 \times 10^6$ após 24 horas. Com 500,0ug, mesmo depois de 72 horas, os PMN compunham 20% do exsudato peritonial. As mononucleares sofreram um pequeno aumento a partir das 24 horas que persistiu até 72 horas, mas que não apresentou diferenças com as doses usadas.

O ácido lipoteicóico (LTA) provocou uma resposta celular pequena com as doses de 0,5 e 5,0ug, mas com 50,0ug o número total de células após 6 horas atingiu $10,2 \times 10^6$ (Fig. 9). Este aumento foi devido quase que inteiramente aos PMN, o mesmo ocorrendo com as doses menores, apenas que com menor intensidade. Com a maioria das substâncias usadas, o acúmulo máximo de PMN ocorreu após 24 horas; entretanto, o LTA foi mais ativo durante as primeiras 6 horas, caindo de maneira intensa posteriormente, tendo valores normais após 72 horas. O efeito nas mononucleares foi menos evidente, mas houve um pequeno aumento destas células a partir das 24 horas.

A fração obtida da placa dental apresentou atividade mesmo a uma concentração de 2,0ug (Fig. 10). Com 2,0ug e 20,0ug os efeitos foram semelhantes e proporcionais às doses usadas. Nas primeiras 24 horas, houve um aumento no número total de células, atingindo um máximo de $9,92 \times 10^6$ com 2,0ug e $17,6 \times 10^6$ com 20,0ug. As células mononucleares praticamente não se alteraram com 2,0ug, mas com 20,0ug houve inicialmente um pequeno decréscimo, atingindo, depois de 24 horas, valores superiores aos normais. Aumentando-se a dose para 200,0ug, não houve um aumento proporcional na resposta inflamatória. Durante as primeiras 24 horas ocorreu um evidente decréscimo de mononucleares, atingindo $1,84 \times 10^6$ após 6 horas, com um aumento gradativo até 72 horas, quando atingiu valores próximos aos alcançados com 20,0ug. A migração de PMN foi menor do que a obtida com 20,0ug até as 24 horas, entretanto quando com 20,0ug começou a haver uma diminuição de PMN, com 200,0ug estas células continuaram a aumentar até 72 horas, constituindo cerca de 50% das células presentes na cavidade peritoneal. O aquecimento da fração da placa dental a 100°C não alterou sua ação sobre os leucócitos. O efeito inflamatório da placa foi reduzido de $18,0 \times 10^6$ células para $7,2 \times 10^6$ após a desacetilação (Tab. 3). Portanto o tratamento com hidróxido de sô-

dio não aboliu os efeitos inflamatórios da placa dental.

A figura 11 mostra um resumo da capacidade das diversas substâncias usadas em atrair PMN no peritônio de camundongo, 24 horas após a administração. A concentração das substâncias varia de acordo com a capacidade de causar migração leucocitária. Assim sendo o V-LPS está representado com 0,5ug visto ser bastante potente, enquanto que o dextrano mesmo com 500,0ug provocou um acúmulo mínimo de PMN. A figura 12 é semelhante à 11, apenas que para mononucleares, e 72 horas após a injeção da substância na cavidade peritoneal. Estes tempos foram escolhidos visto que parecem representar bem, o efeito das substâncias nos PMN e nos mononucleares.

PRESENÇA DE COMPLEMENTO (C), ALBUMINA E IMUNOGLOBULINAS (Ig) NO FLUIDO PERITONIAL

Para a comparação da dinâmica da migração celular com o extravasamento de componentes plasmáticos, foi feita a quantificação de C, albumina e Ig no fluido peritoneal, através da técnica da imunodifusão radial simples. A curva padrão foi construída usando-se soro normal de camundongo (Fig. 13), levando-se em consideração o quadrado do diâmetro da área de precipitação do complexo antígeno-anticorpo. Os fluidos peritoneais dos animais controles apresentaram de 16 a 20% de C, albumina e Ig em relação à concentração presente no soro usado como padrão. Com 0,5ug de V-LPS, o acúmulo máximo de C e albumina ocorreu após 24 horas, diminuindo posteriormente e atingindo valores normais depois de 72 horas (Fig. 14). O aumento e diminuição de C e albumina coincidiu com a migração de PMN, e quando as mononucleares ainda estavam migrando para o peritônio, os níveis de C e albumina estavam voltando ao normal. As imunoglobulinas estavam aumentadas depois de 24 horas e diminuíram apenas depois de 48 horas. Com o S-LPS

praticamente não houve variações nos níveis das substâncias estudadas, embora após 48 horas, o número de PMN, e após 72 horas, o número de mononucleares estivesse ligeiramente aumentado (Fig. 15). O E-LPS usado a 5,0ug não aumentou a quantidade de Ig durante todo o experimento, enquanto o C e a albumina acompanharam a migração e desaparecimento de PMN (Fig. 15). Os mutanos I e II também não alteraram a quantidade de Ig, mas o mutano I causou um acúmulo máximo de albumina após 6 horas e o mutano II após 24 horas, embora em menor grau (Fig. 16). O C com o mutano I aumentou das 6 horas até às 24 horas, caindo posteriormente. Com o mutano II, o C aumentou apenas após 24 horas, com um decréscimo após 48 horas, e voltando aos valores normais depois de 72 horas. Com as duas substâncias, enquanto o número de mononucleares ainda estava aumentando, a quantidade de albumina caía acentuadamente. O *A. viscosus* também foi capaz de provocar um acúmulo de C e albumina, que se iniciou após 6 horas, atingindo o máximo após 24 horas (Fig. 17). As Ig sofreram um pequeno aumento após 24 horas, quando chegaram a 24%. A placa dental provocou uma exsudação de C e albumina que acompanhou exatamente a migração de PMN (Fig. 17), iniciando-se após 6 horas, com um pico depois de 24 horas caindo posteriormente a níveis próximos do normal. As Ig estavam acima do normal durante todo o experimento, mas com valores muito menores aos atingidos pelo C e pela albumina. Com o lipídio A houve um acúmulo máximo de C, albumina e Ig após 24 horas e com LTA após 6 horas (Fig. 18).

De uma maneira geral, houve um paralelismo entre a migração de PMN e o acúmulo de C e de albumina, o mesmo não acontecendo com as Ig e mononucleares. Na figura 19, temos uma relação entre níveis de C e quantidade de PMN, 24 horas após a injeção intraperitoneal das substâncias estudadas.

FAGOCITOSE

Nas figuras 20, 21 e 22 estão os resultados dos testes de fagocitose com as diversas substâncias usadas. Cerca de 50% das células mononucleares dos animais controles fagocitaram partículas de *Candida albicans* (CA), mas a grande maioria continha apenas de 1 a 3 partículas. A placa dental aumentou não só o número de células que fagocitaram, como também o número de partículas presentes em cada célula individualmente, tendo cerca de 21% de macrófagos com 4 ou mais partículas em comparação a 3% do controle. O V-LPS também foi bastante ativo, mesmo a uma dose de 0,5 ug, entretanto o tratamento com hidróxido de sódio aboliu esta propriedade. O S-LPS e B-LPS, foram menos potentes que o V-LPS, e o aumento foi devido ao número de células que fagocitaram de 1 a 3 partículas. O lipídio A foi uma das substâncias que, com uma concentração não muito alta (5,0ug) aumentou em muito o índice de fagocitose, tanto em número total como em proporções de células contendo 4 ou mais CA. O LTA a uma concentração de 5,0ug, o dextrano e o levano a 500,0ug apresentaram resultados semelhantes ao controle. O mutano II foi praticamente inativo, enquanto que o mutano I potenciou de maneira intensa a fagocitose, com apenas 20% das células não tendo partículas de CA. A fração solúvel do *A. viscosus* também potenciou a fagocitose tanto no número total de células como no número de partículas presentes em cada uma individualmente. Houve uma relação direta entre a capacidade da substância em estimular a fagocitose e a de causar o acúmulo de leucócitos no peritônio (Fig. 23).

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM LPS NA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO PERITÔNIO DE CAMUNDONGOS

Dos três LPS usados (E-LPS, S-LPS e V-LPS) o menos ativo para causar migração celular foi o S-LPS, enquanto que o mais potente foi o V-LPS, atraindo $17,0 \times 10^6$ PMN após 24 horas, em comparação com 2×10^6 e 9×10^6 dos S-LPS e E-LPS respectivamente (Fig. 24). O E-LPS e o S-LPS causaram uma diminuição inicial de mononucleares, e posteriormente um aumento gradativo até 72 horas, atingindo aproximadamente $6,3 \times 10^6$ células. O V-LPS causou um aumento contínuo de mononucleares, com um máximo de $13,2 \times 10^6$ após 72 horas.

A população celular do peritônio de camundongos não estava modificada 7 dias após a injeção endovenosa de 10,0ug de V-LPS, E-LPS ou S-LPS. 7 dias após a administração intraperitoneal de 10,0ug de E-LPS, o total de células estava ligeiramente acima do normal; com S-LPS o número era de $6,9 \times 10^6$ e com V-LPS de $10,2 \times 10^6$, sendo que as mononucleares constituíam cerca de 98,0% das células presentes, e o número de PMN era mínimo (Fig. 25). Para se verificar o efeito do pré-tratamento com LPS na reação inflamatória, foi feito um estudo comparando-se a resposta celular no peritônio de animais controles e de animais pré-tratados com injeções intraperitoneal ou endovenosa de 10,0ug de LPS, 7 dias antes do teste.

Camundongos pré-tratados endovenosamente com 10,0ug de V-LPS e depois de 7 dias desafiados com 0,5ug da mesma substância, tiveram após 24 horas uma resposta inflamatória cerca de duas vezes maior que a do grupo controle. Esta resposta acentuada foi principalmente causada por um aumento de mononucleares, e a um pequeno acréscimo de PMN. Os animais pré-tratados com 10,0 ug intraperitonealmente, depois de 7 dias quando desafiados com 0,5ug, apresentaram uma resposta inflamatória menor que os contro

les (Fig. 26). Esta redução foi causada por uma migração menor de PMN, $2,1 \times 10^6$ em relação a $12,0 \times 10^6$ dos controles. A administração de 10,0ug de V-LPS intraperitonealmente manteve um número aumentado de células no peritônio mesmo após 20 dias. Na figura 27, temos a comparação da inflamação causada por 0,5ug de V-LPS no peritônio de camundongos controles e pré-tratados com V-LPS 20 dias antes do desafio. A resposta continuou menor nas primeiras 24 horas nos pré-tratados com V-LPS, devido a um decréscimo na migração de PMN. Tanto nos controles como nos pré-tratados as mononucleares aumentaram de maneira semelhante a partir de 24 horas, com valores próximos às 48 e 72 horas. Para verificar a especificidade desta resposta inflamatória diminuída, camundongos pré-tratados intraperitonealmente com 10,0ug de V-LPS foram depois de 20 dias desafiados com 5,0ug de E-LPS. 24 horas depois do desafio, o E-LPS causou a migração de $7,8 \times 10^6$ PMN nos controles, em comparação com $2,7 \times 10^6$ nos pré-tratados com V-LPS (Fig. 28). A comparação da capacidade fagocitária das células peritoniais de animais controles e pré-tratados endovenosamente ou intraperitonealmente com 10,0ug de V-LPS, foi feita usando-se partículas de CA. Como se pode observar na figura 29, as células de animais controles e tratados endovenosamente apresentaram capacidade semelhante de fagocitar CA, enquanto que a fagocitose das células dos camundongos tratados intraperitonealmente foi maior.

Os animais pré-tratados intraperitonealmente com 10,0ug de E-LPS, depois de 7 dias apresentaram as células mononucleares ligeiramente acima do normal, enquanto que os injetados endovenosamente não mostravam nenhuma diferença em relação aos controles. 24 horas após o desafio com 5,0ug de E-LPS, os animais pré-tratados apresentaram uma resposta maior que os controles, ou seja, $16,0 \times 10^6$ para os pré-tratados intraperitonealmente, $21,0 \times 10^6$ para os pré-tratados endovenosamente, em contraste ao valor $10,4 \times 10^6$ observado no grupo controle (Fig. 30). O aumento no número de cé

lulas foi causado principalmente pelas mononucleares com valores de $3,2 \times 10^6$ nos controles e $8,4 \times 10^6$ nos pré-tratados. Os pré-tratados no peritônio não apresentaram uma diminuição no número de PMN como ocorreu com o V-LPS, e esta célula estava acima do controle nos injetados endovenosamente.

Após 7 dias da injeção endovenosa de 10,0ug de S-LPS, o peritônio apresentava-se em condições semelhantes ao normal em termos de células residentes, ao passo que o tratamento intraperitôntonal causou um ligeiro aumento de mononucleares. Os animais pré-tratados intraperitôntonalmente tiveram após o desafio uma resposta ligeiramente acima dos controles. Nos camundongos pré-injetados endovenosamente, o aumento da resposta celular após o desafio foi drástico, tanto em termos de mononucleares como de PMN, apresentando $18,1 \times 10^6$ células em comparação com $4,7 \times 10^6$ dos controles (Fig. 31). Dos 3 grupos, apenas o pré-tratado endovenosamente teve um aumento de mononucleares, 24 horas após ao desafio, ao invés de uma diminuição.

Grupos de animais pré-tratados endovenosamente com 10,0 ug de V-LPS, E-LPS e S-LPS, foram depois de 7 dias desafiados no peritônio com 50,0ug de *A. viscosus*, e o exsudato celular quantificado após 24 horas. Pode-se observar pela figura 32 que todos os grupos tiveram uma resposta semelhante. Como a administração intraperitôntonal de V-LPS causou, mesmo após 7 dias, um aumento na atividade fagocitária das células mononucleares, procurou-se verificar se o mesmo ocorria com os outros dois LPS (Fig. 33). Foi confirmado o efeito do V-LPS, mas o E-LPS e S-LPS não causaram aumento da fagocitose.

Na tabela 4 pode-se observar que nos animais pré-tratados com V-LPS não foi possível detectar anticorpos específicos, nem no soro nem no fluido peritôntonal, enquanto que nos pré-injetados com E-LPS e S-LPS imunoglobulinas específicas estavam presentes nos dois compartimentos, com um título maior na corrente cir-

culatória. A injeção endovenosa de duas doses de LPS, causou um aumento nos títulos de anticorpos a E-LPS (1:1024) e S-LPS (1:2048), entretanto com V-LPS o resultado novamente foi negativo. Usou-se a técnica de Cunningham e Szenberg (1968) para a contagem de células formadoras de anticorpos, e mais uma vez apenas os animais tratados com E-LPS e S-LPS deram resultados positivos (Tab. 4).

A modificação da resposta inflamatória por imunoglobulinas foi estudada usando-se a técnica da transferência passiva de anticorpos (Fig. 34). Um grupo de camundongos recebeu 0,2ml de soro contendo anti-S-LPS e o outro a mesma quantidade de soro normal de camundongo. Depois de trinta minutos o título de anti-S-LPS na corrente sanguínea do grupo controle era zero, e do que recebeu anti-LPS de 1:512. Todos os animais foram então injetados intraperitonealmente com 5,0ug de S-LPS. Depois de 24 horas o grupo controle continuava com título zero, e o tratado com 1:64 no sangue e 1:16 no fluido peritoneal. A resposta inflamatória dos que receberam anticorpos estava aumentada em relação aos controles, tendo $8,1 \times 10^6$ células, em comparação a $3,4 \times 10^6$ dos controles. Esta diferença foi devida quase exclusivamente ao aumento no número de PMN.

FIGURAS

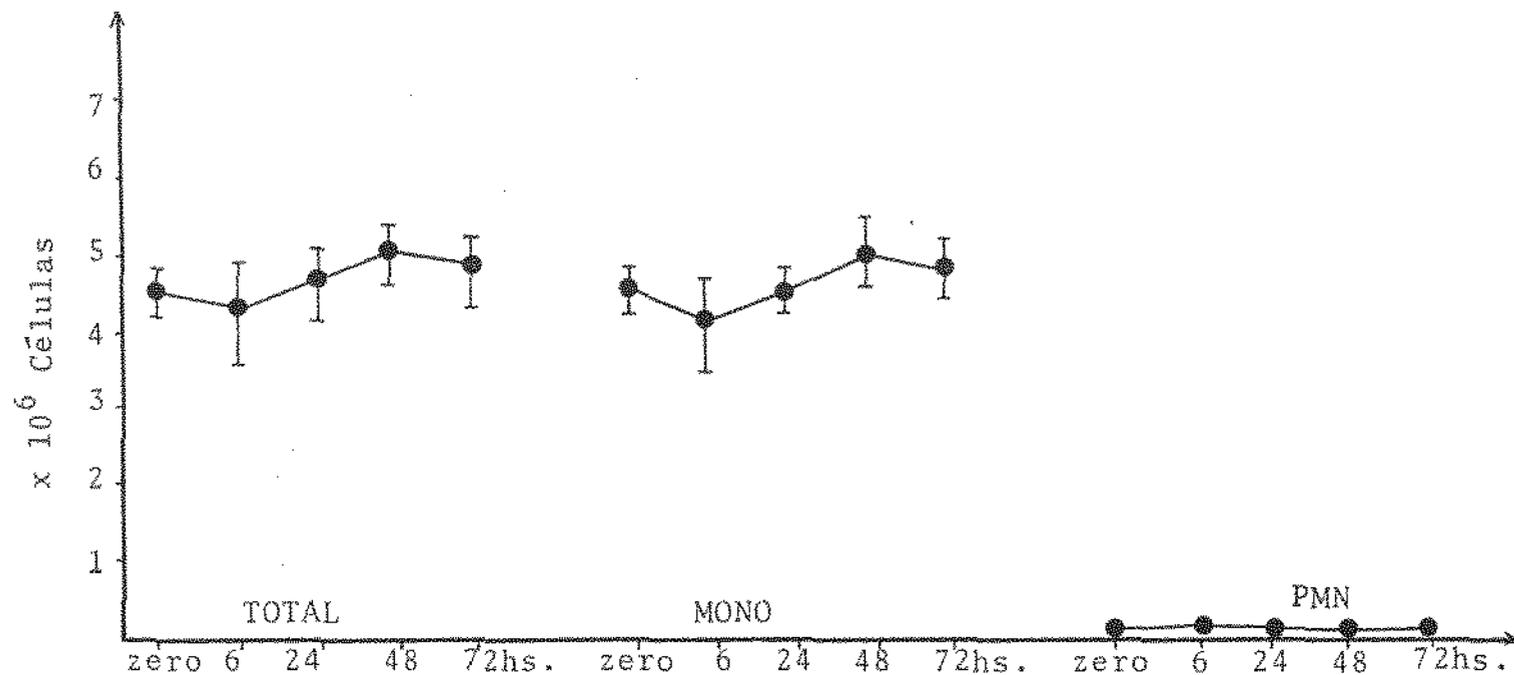


Figura 1- Acúmulo de células no peritônio de camundongos 6, 24, 48 e 72 horas após a administração de 0,1ml de solução fisiológica na cavidade peritoneal. O tempo zero foi obtido de animais não inoculados. Cada ponto representa a média de 4 animais \pm erro padrão da média. Isto é válido para todas as tabelas e figuras, a não ser que seja especificada a modificação.

TOTAL = Número total de leucócitos

MONO = Células mononucleares

PMN = Células polimorfonucleares

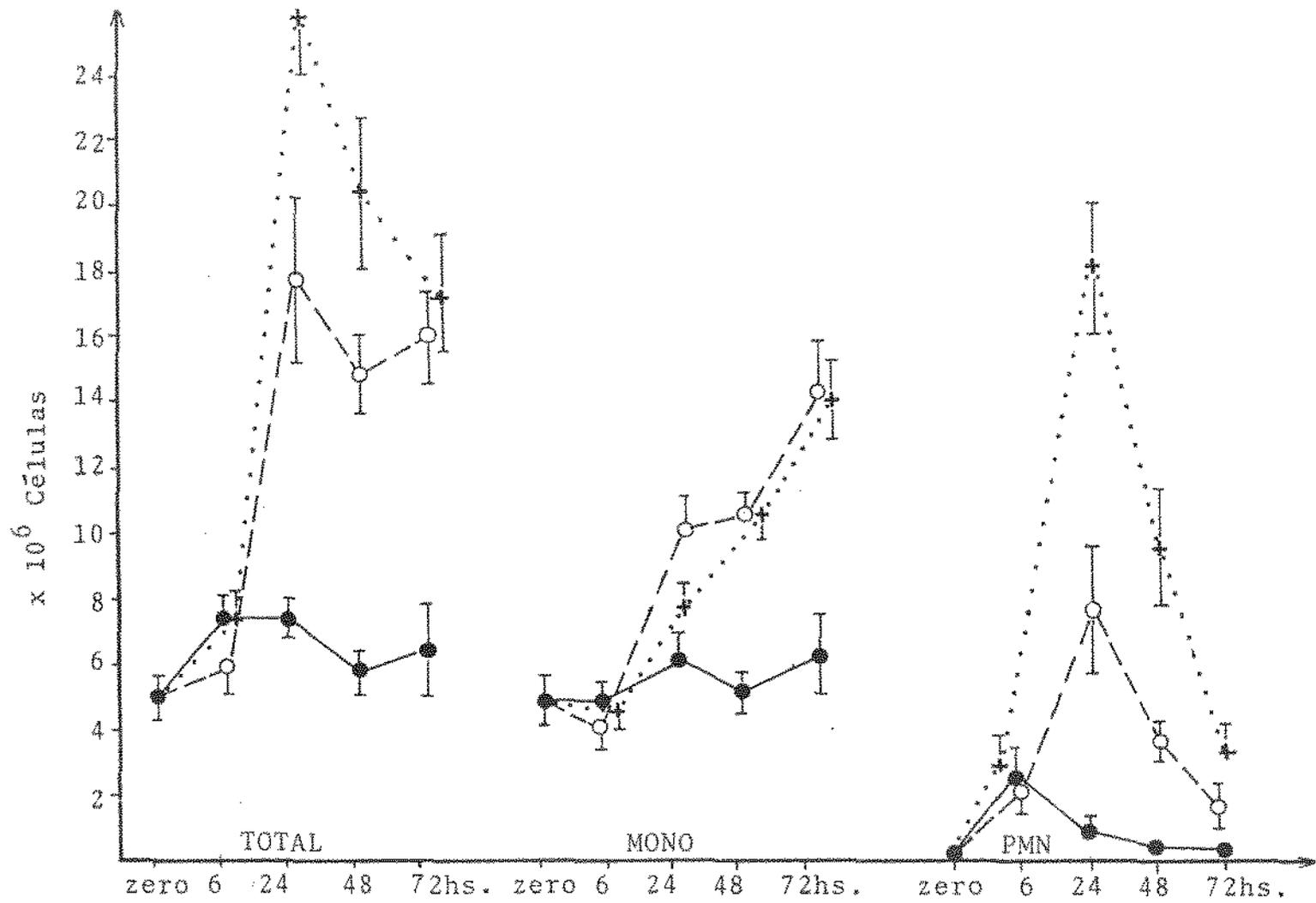


Figura 2- Cinética da resposta inflamatória no peritônio de camundongos 6, 24, 48 e 72 horas após a administração intraperitoneal do lipopolissacarídeo da *Veillonella alcalescens* (V-LPS).

0,05ug ●—●
 0,5 ug ○—○
 5,0 ug +.....+

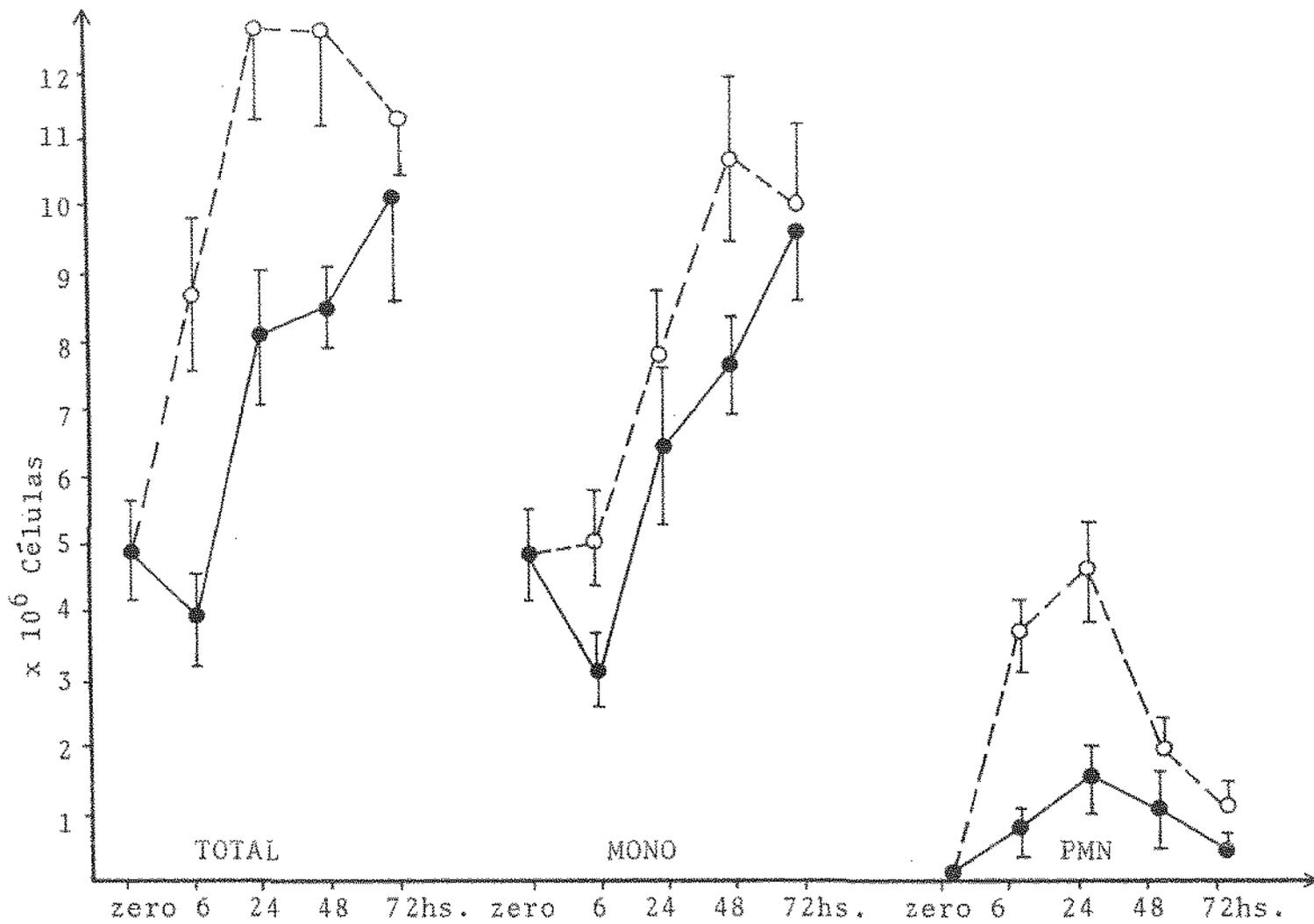


Figura 3- Cinética do acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos após a injeção intraperitoneal do Lipídio A.

0,5ug ●—●
 5,0ug ○—○

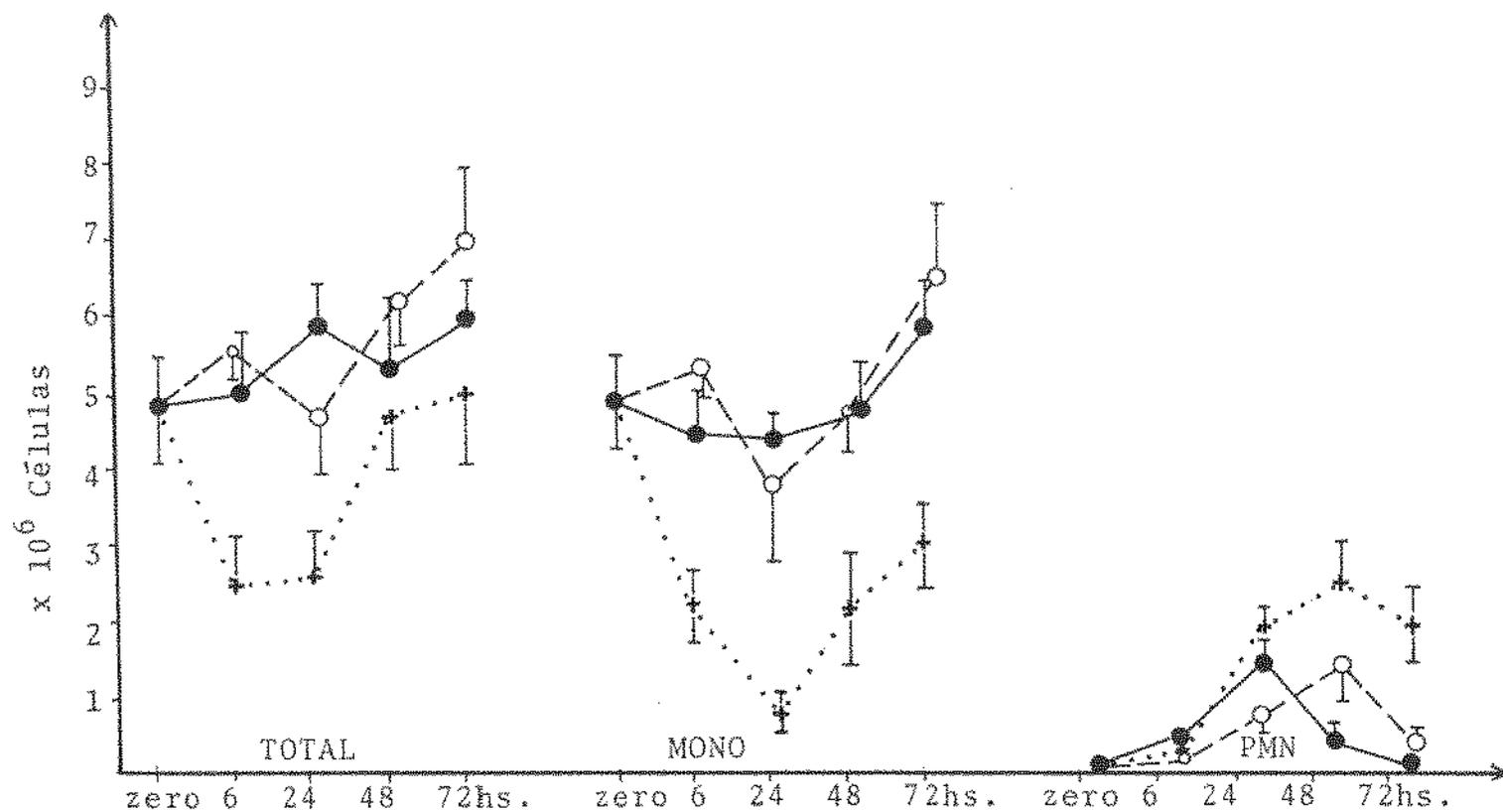


Figura 4- Cinética da resposta inflamatória no peritônio de camundongos após a administração intraperitoneal do lipopolisacarídeo da *Salmonella typhimurium* (S-LPS).

0,5ug ●—●
 5,0ug ○- -○
 50,0ug +.....+

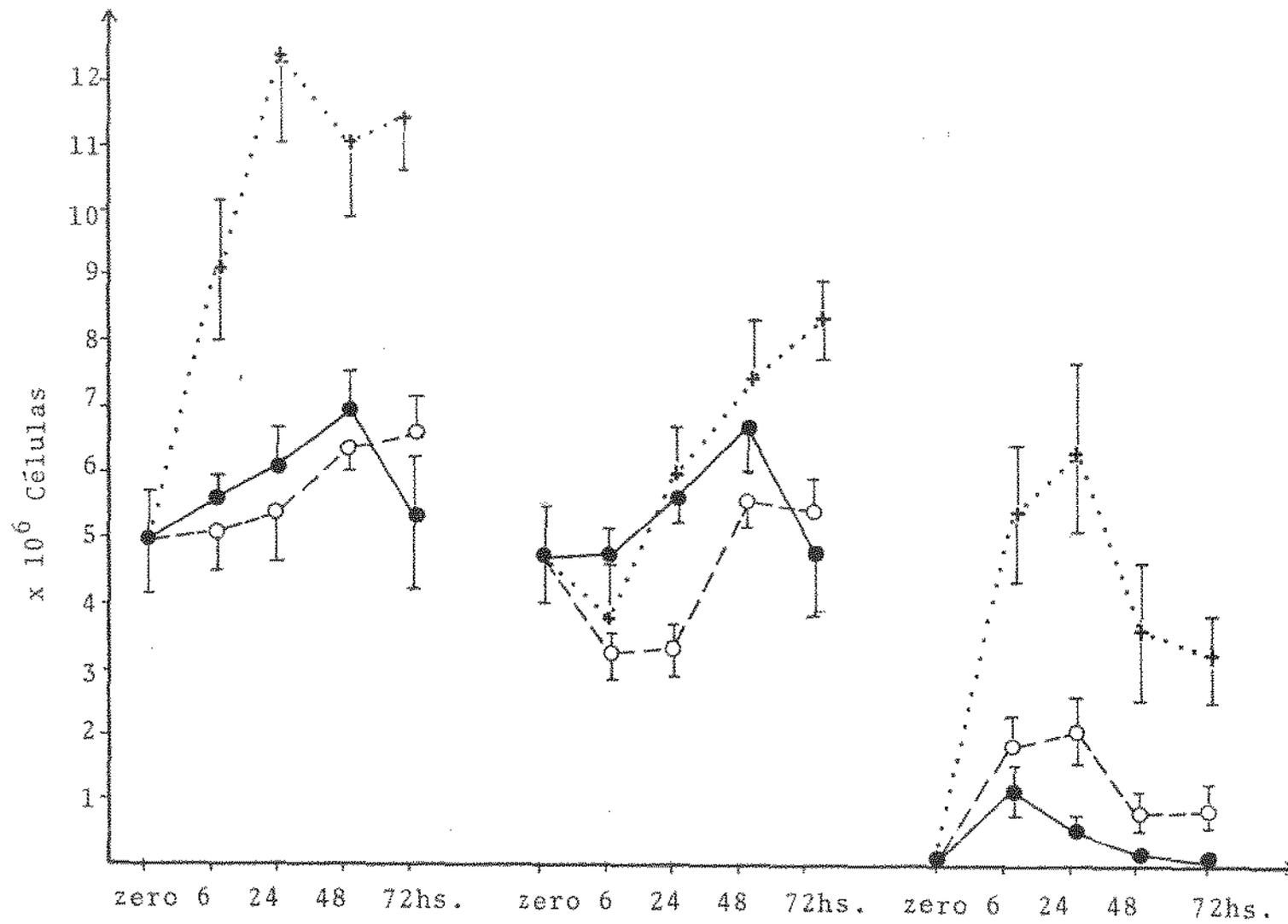


Figura 5- Cinética do acúmulo de células no peritônio de camundongos após a administração intraperitoneal do Mutano I (mais de 99% de ligações α -1,3).

5,0ug ●——●
 50,0ug ○- - -○
 500,0ug +.....+

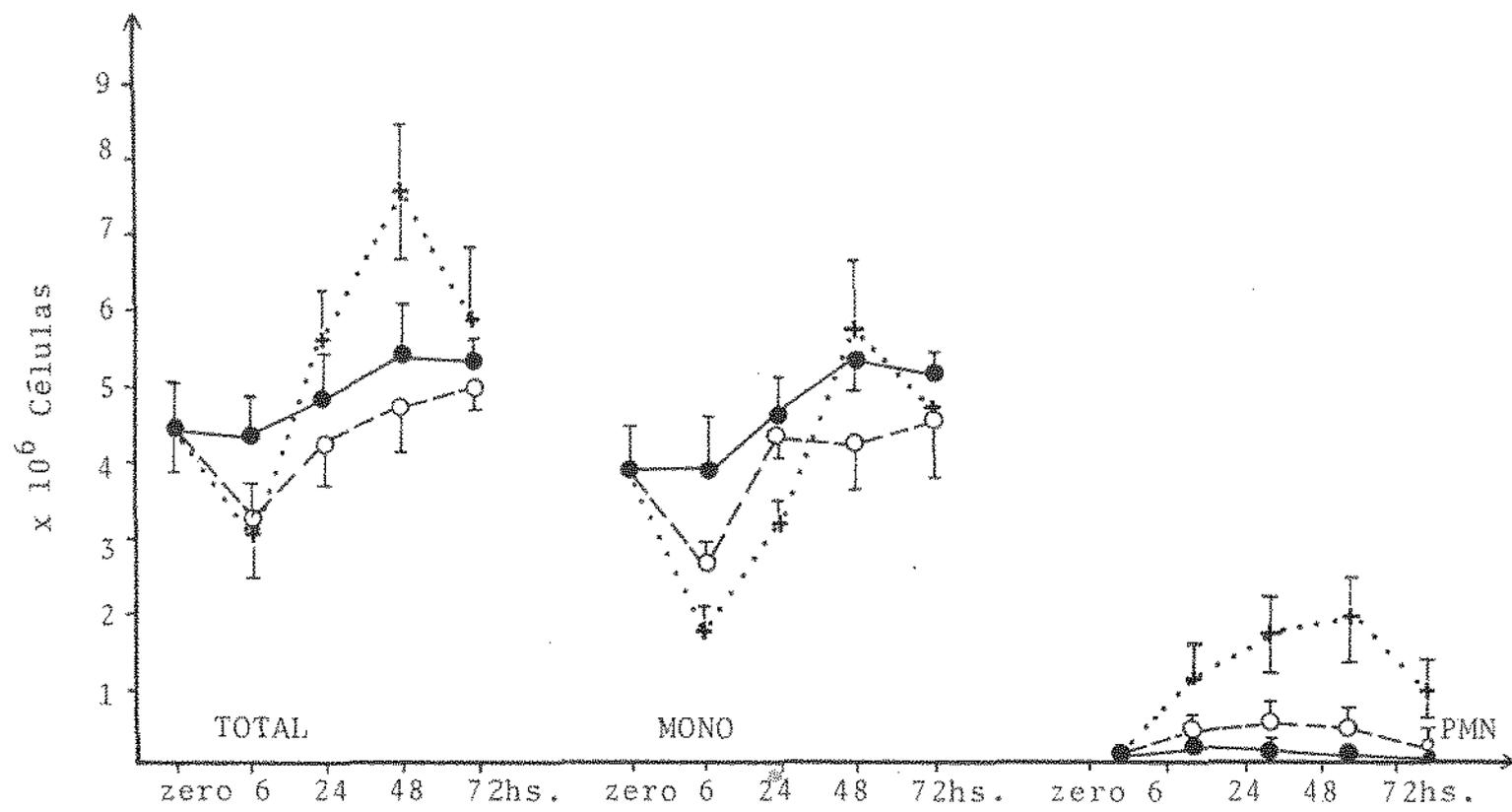


Figura 6- Cinética do acúmulo de células no peritônio de camundongos após a administração intraperitoneal do Mutano II (90% de ligações α -1-3 e 10% de α -1-6).

5,0ug ●—●
 50,0ug ○- -○
 500,0ug +.....+

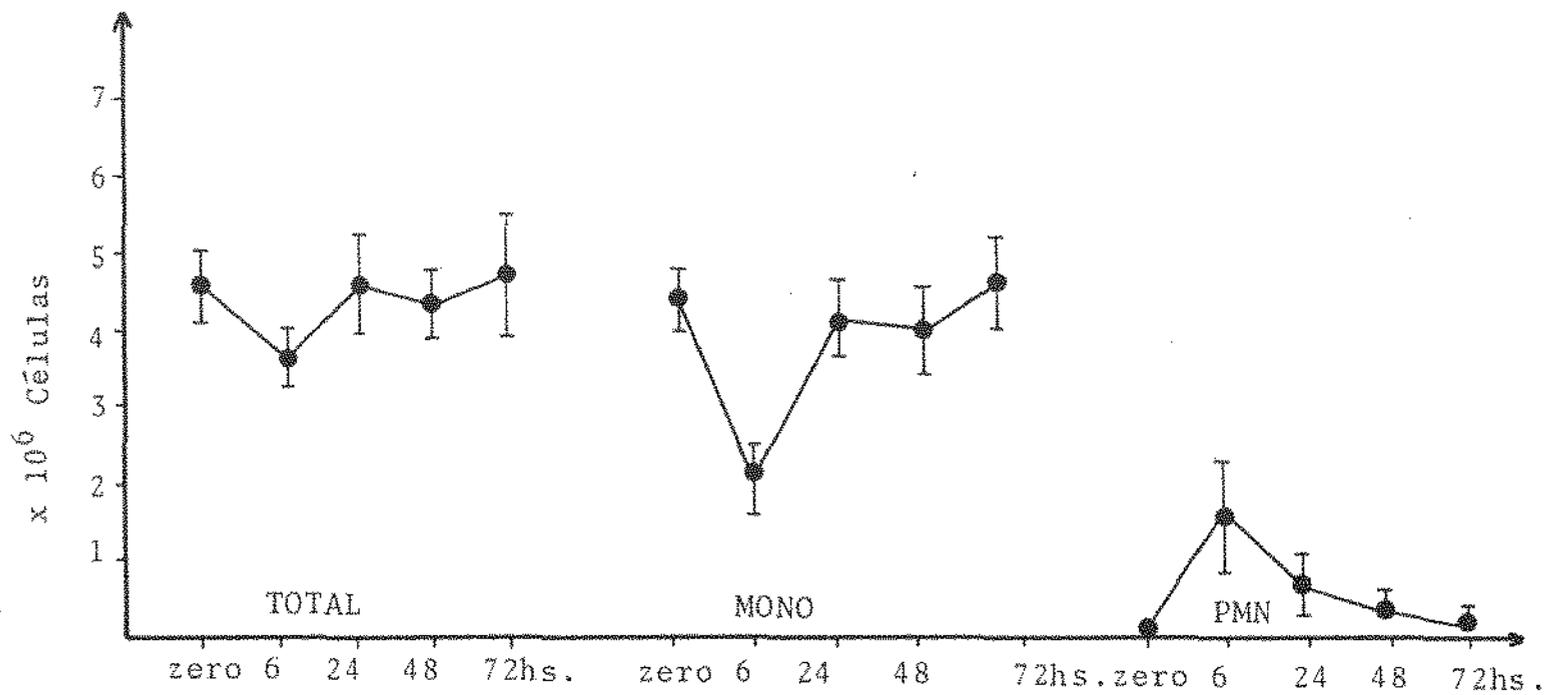


Figura 7- Efeito de 500,0ug de Levano na população celular do peritônio de camundongos.

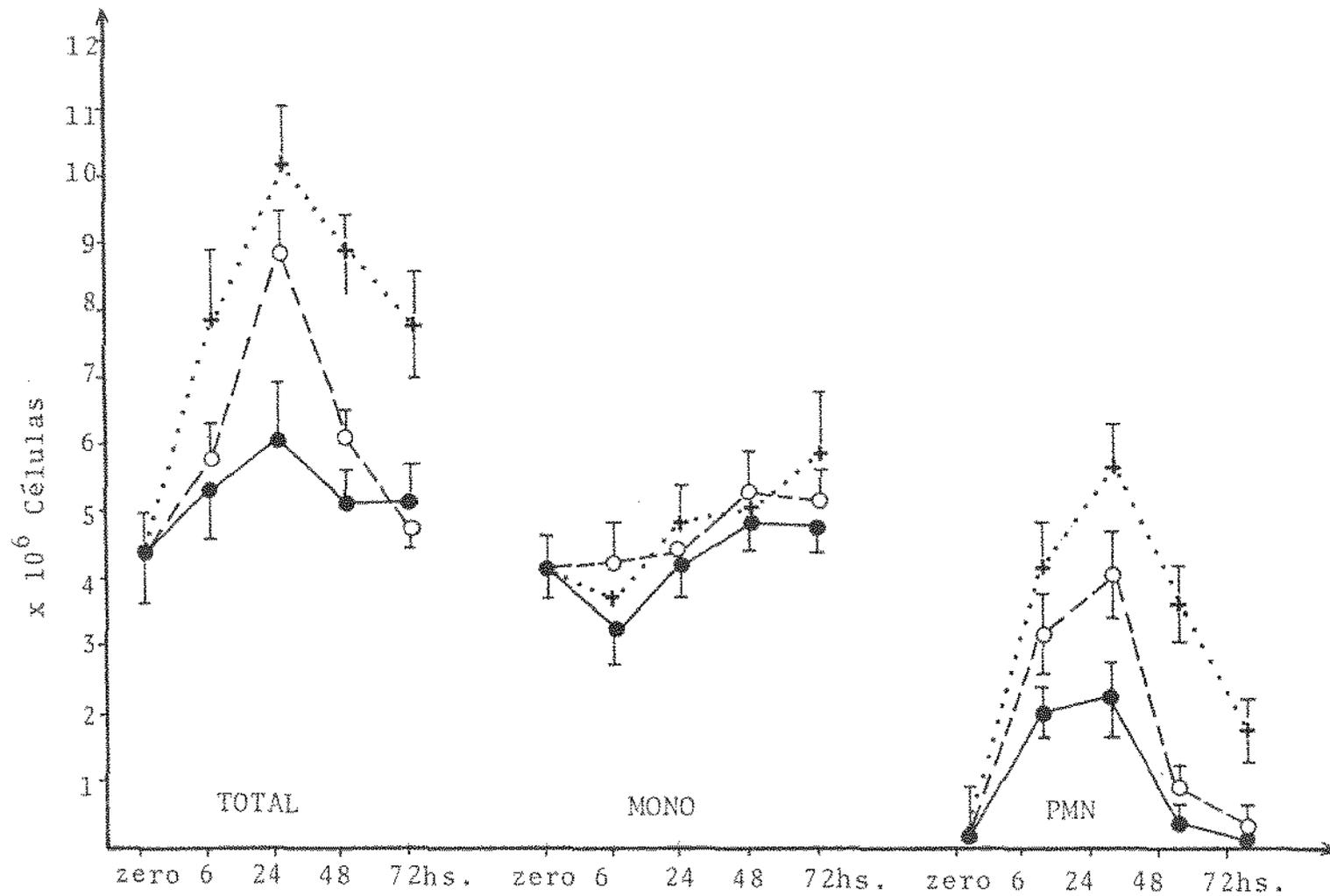


Figura 8- Cinética da resposta inflamatória no peritônio de camundongos após a administração intraperitoneal da fração isolada do *A. viscosus*.

5,0ug ●—●
 50,0ug ○---○
 500,0ug +.....+

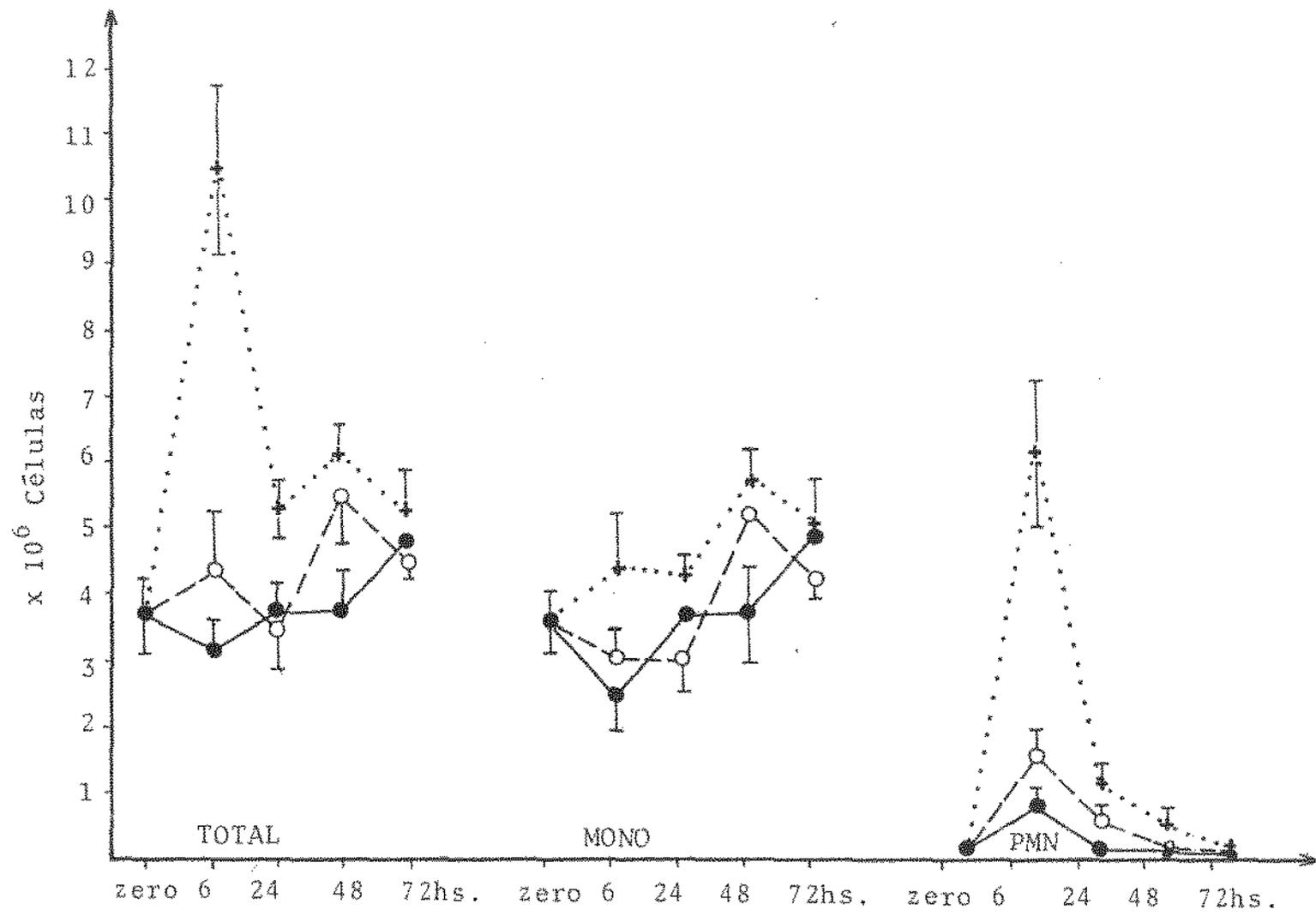


Figura 9- Cinética do acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos após a administração intraperitoneal do Ácido Lipoteicóico (LTA).

0,5ug ●—●
 5,0ug ○---○
 50,0ug +.....+

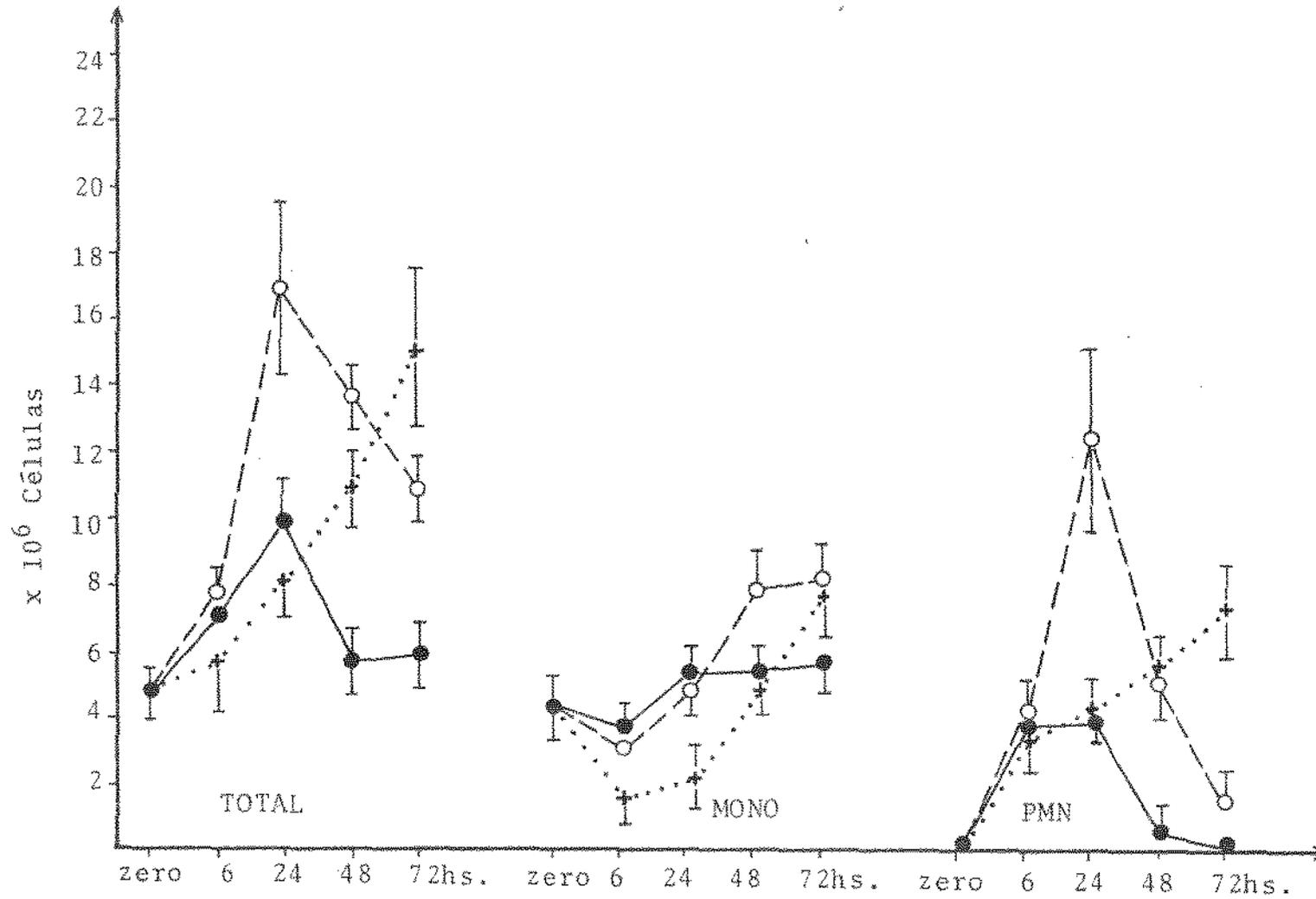


Figura 10- Cinética da reação inflamatória no peritônio de camundongos após a administração intraperitoneal da fração isolada da Placa Dental.

2,0ug ●—●
 20,0ug ○- -○
 200,0ug. +.....+

Figura 11 - Número de PMN presentes no peritônio de camundongos, 24 horas após a administração intraperitoneal das diversas substâncias testadas.

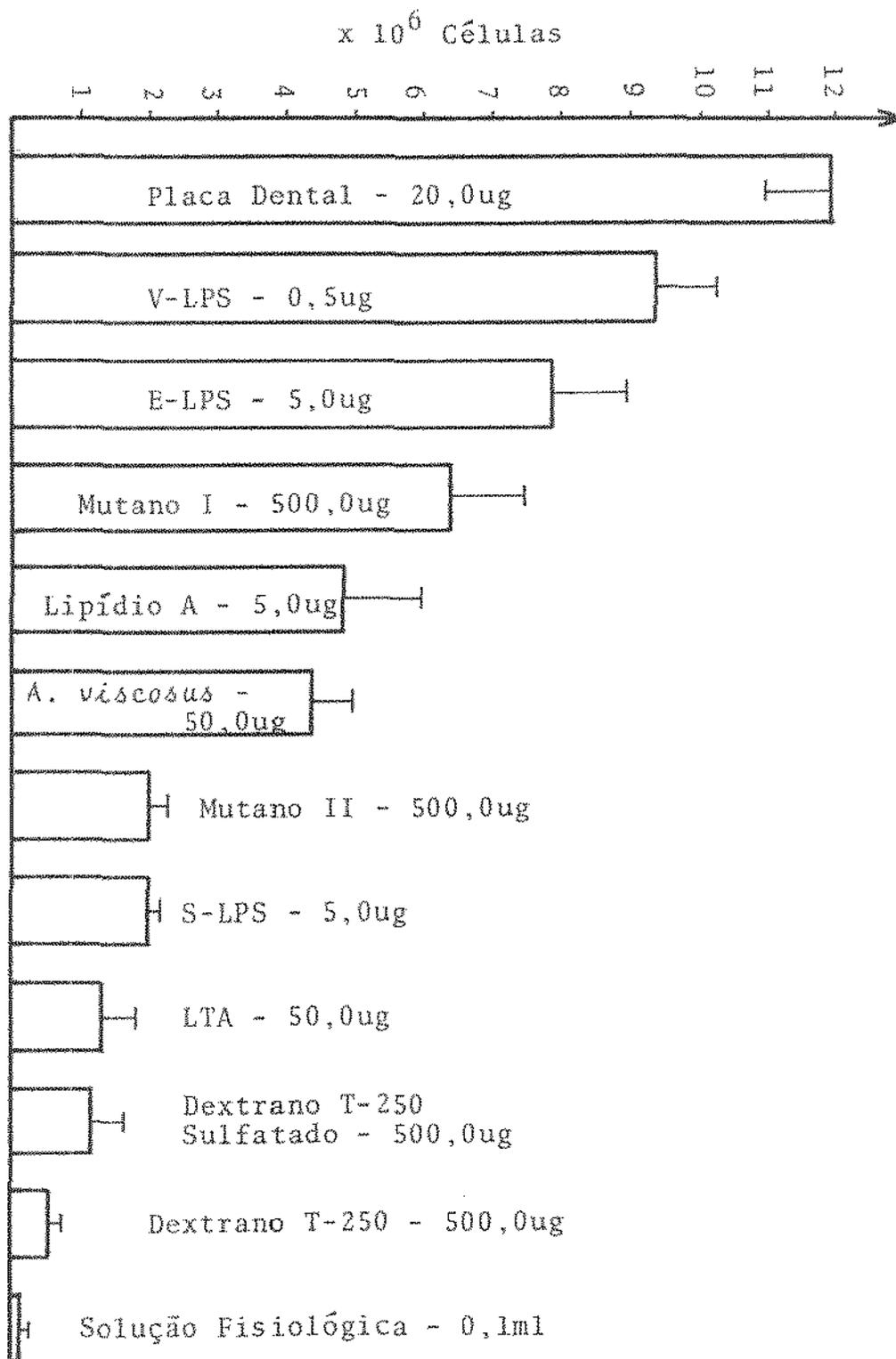
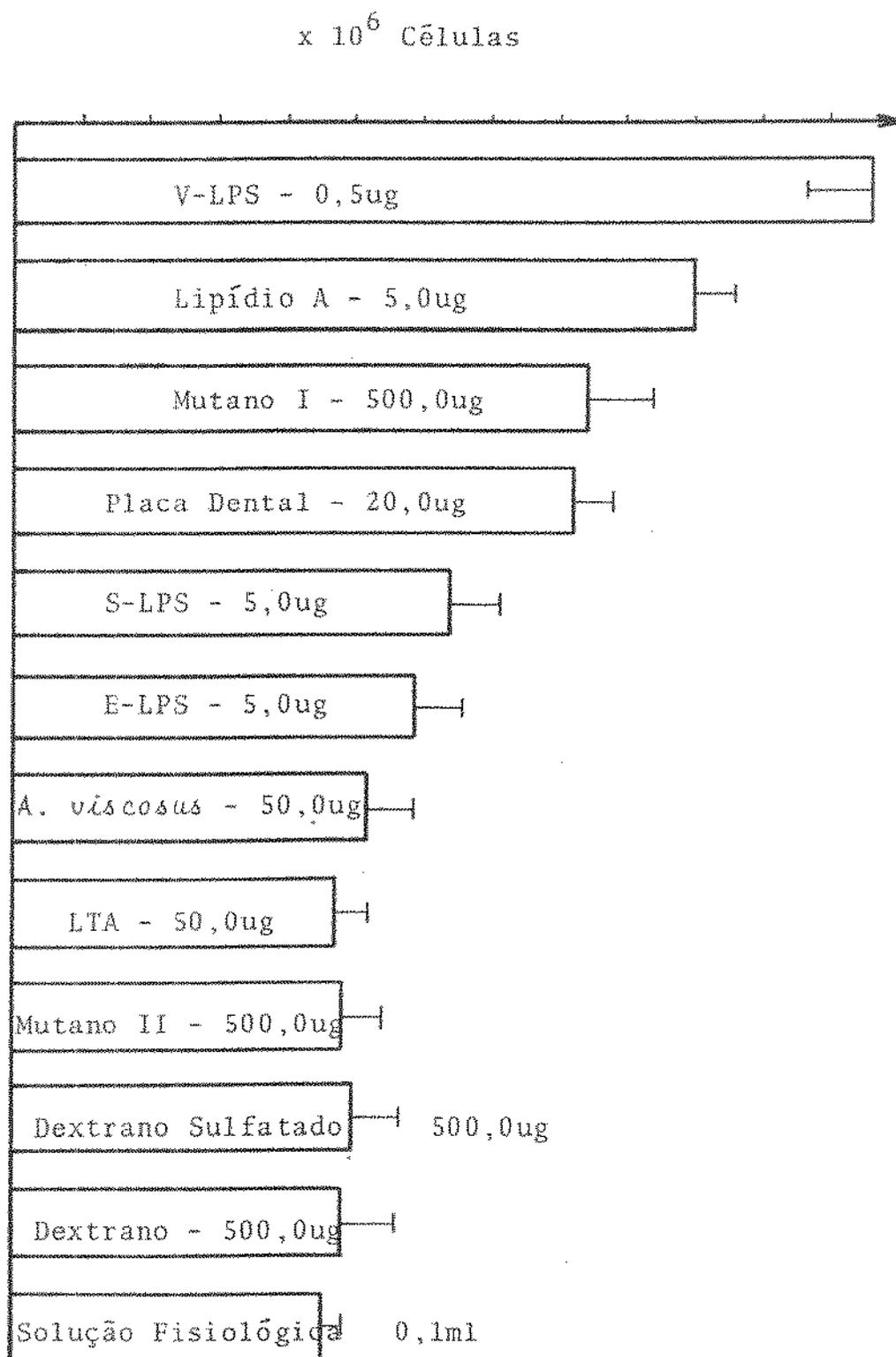


Figura 12- Número de células mononucleares presentes no peritônio de camundongos, 72 horas após a administração intraperitoneal das diversas substâncias testadas.



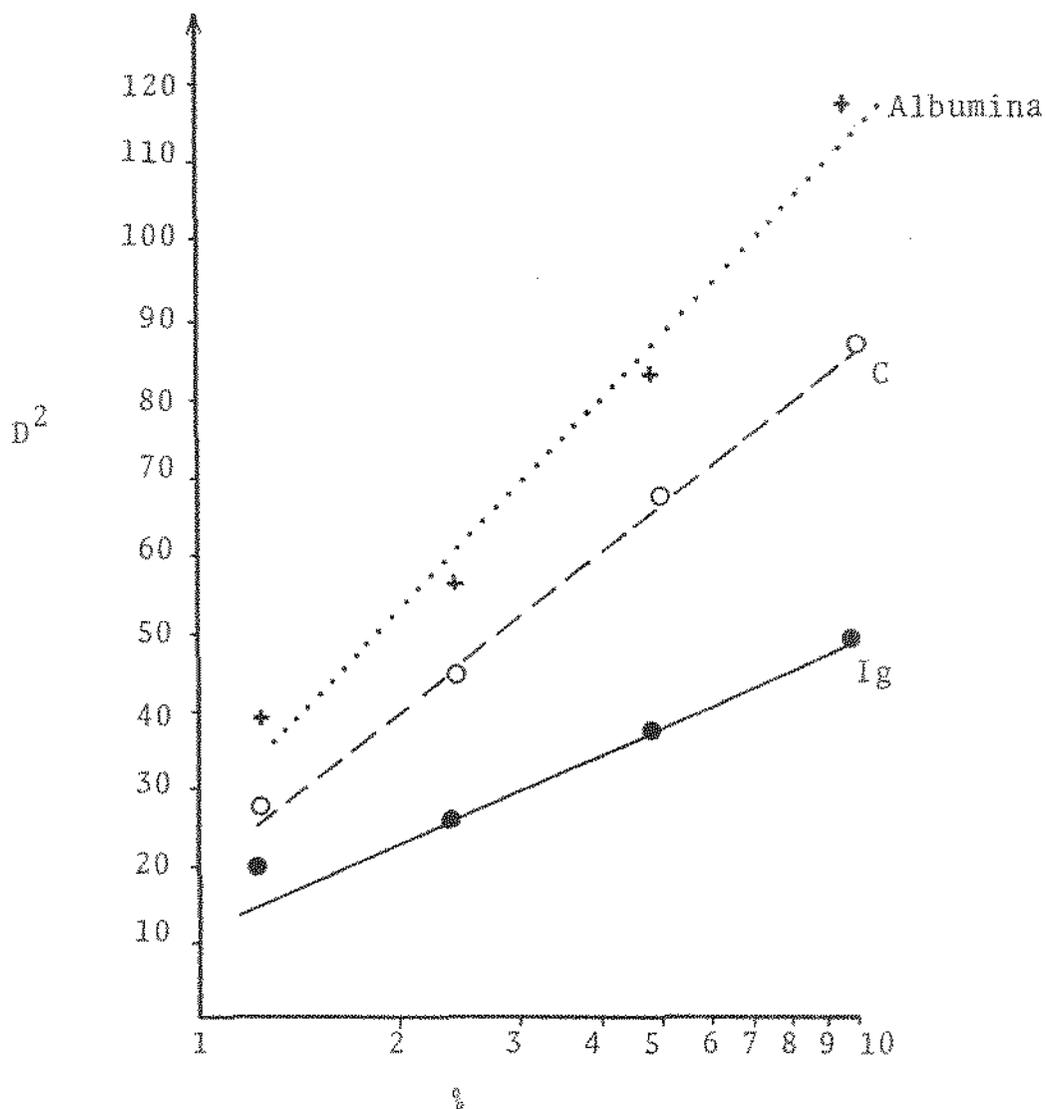


Figura 13- Curvas padrões das concentração de complemento (C), albumina e imunoglobulinas (Ig) no soro normal de camundongo. Estas curvas foram usadas para determinar a quantidade destas substâncias no fluido peritoneal de camundongos, através da técnica de imunodifusão radial simples.

C 100% = soro diluido 1:4

Ig 100% = soro diluido 1:4

Albumina 100% = soro diluido 1:32

D² = quadrado do diâmetro da área de precipitação

% = porcentagem de soro de camundongo 10=100%

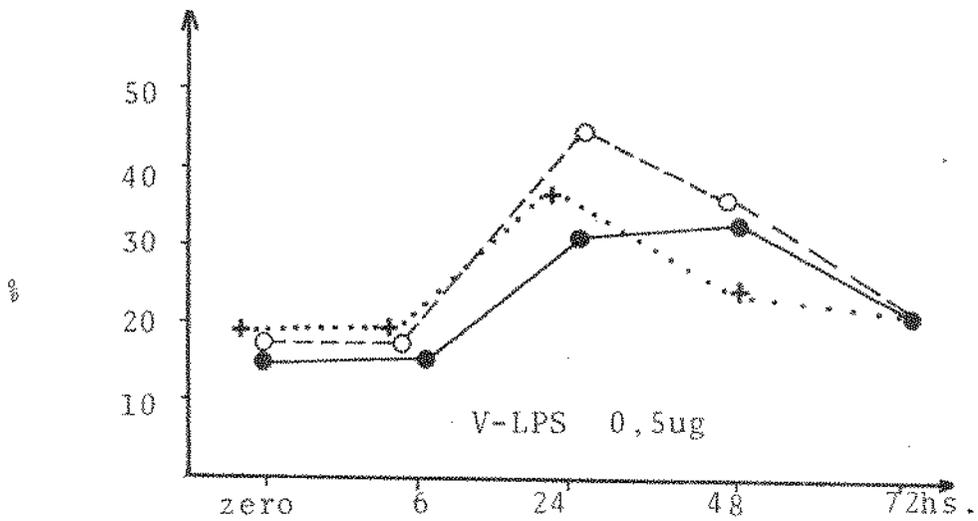


Figura 14- Concentração de complemento (C), albumina e imunoglobulinas (Ig) no fluido peritonial de camundongos injetados com 0,5ug de V-LPS. Os resultados estão expressos em porcentagens, levando-se em consideração a concentração presente no soro padrão.

Ig ●——●
C ○---○
Albumina +.....+

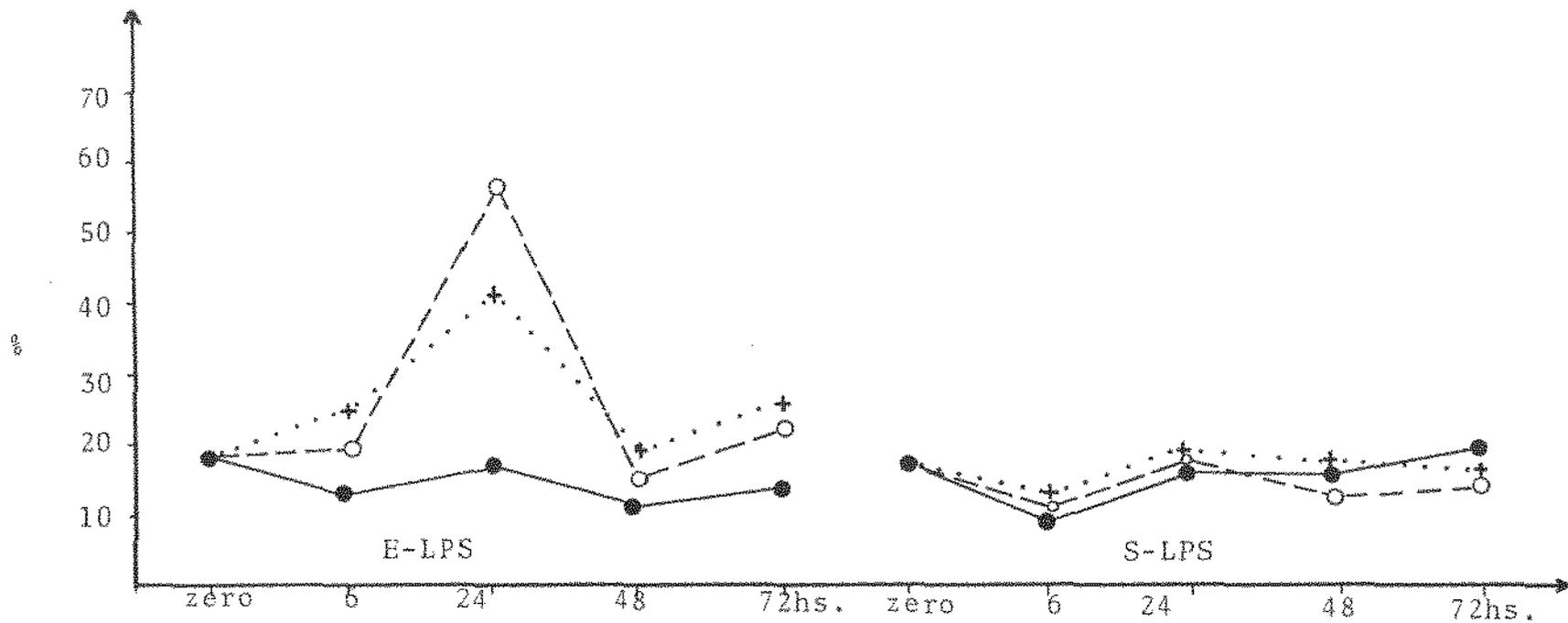


Figura 15- Concentração de complemento (C), albumina e imunoglobulinas (Ig) no fluido peritoneal de camundongos injetados com 5,0ug de E-LPS e 5,0ug de S-LPS

Ig ●——●
 C ○- - -○
 Albumina +.....+

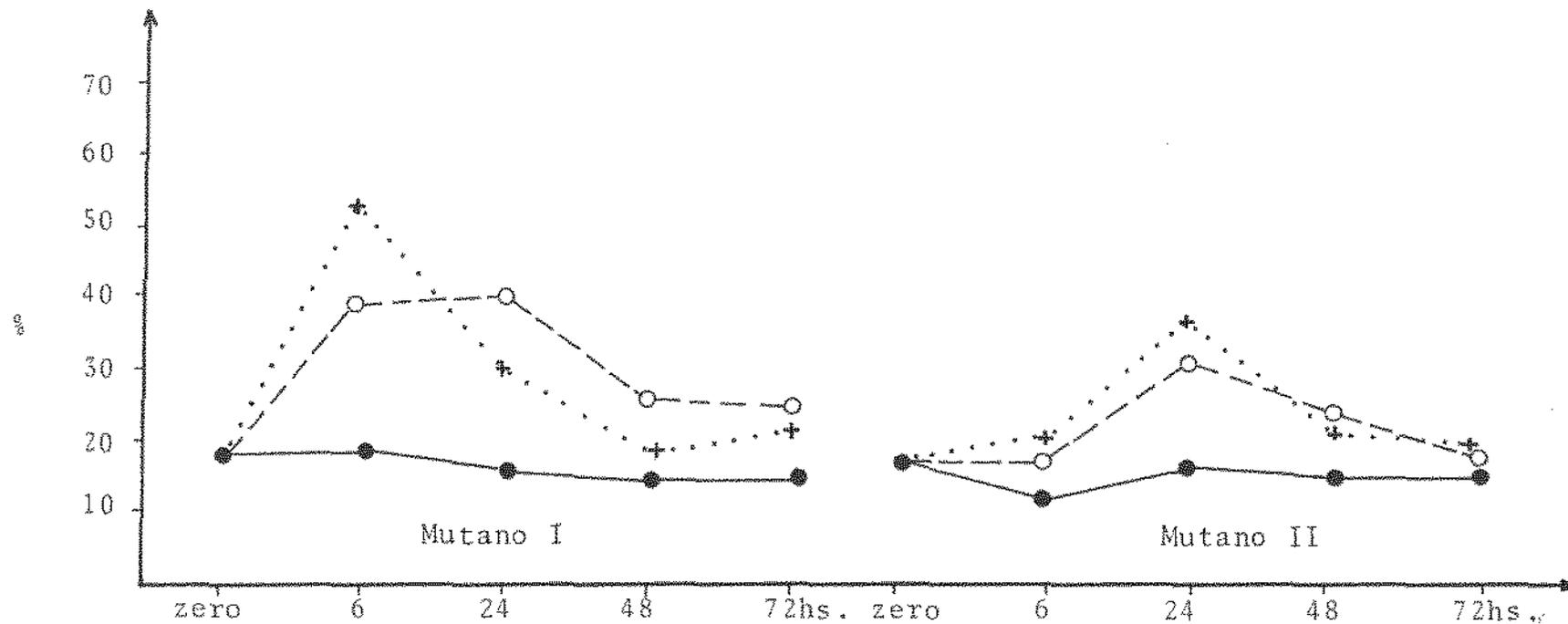


Figura 16- Cinética do acúmulo de complemento (C), albumina e imunoglobulinas (Ig) no fluido peritoneal de camundongos injetados com 500,0ug de Mutano I e 500,0ug de Mutano II.

Ig ●——●

C ○---○

Albumina +.....+

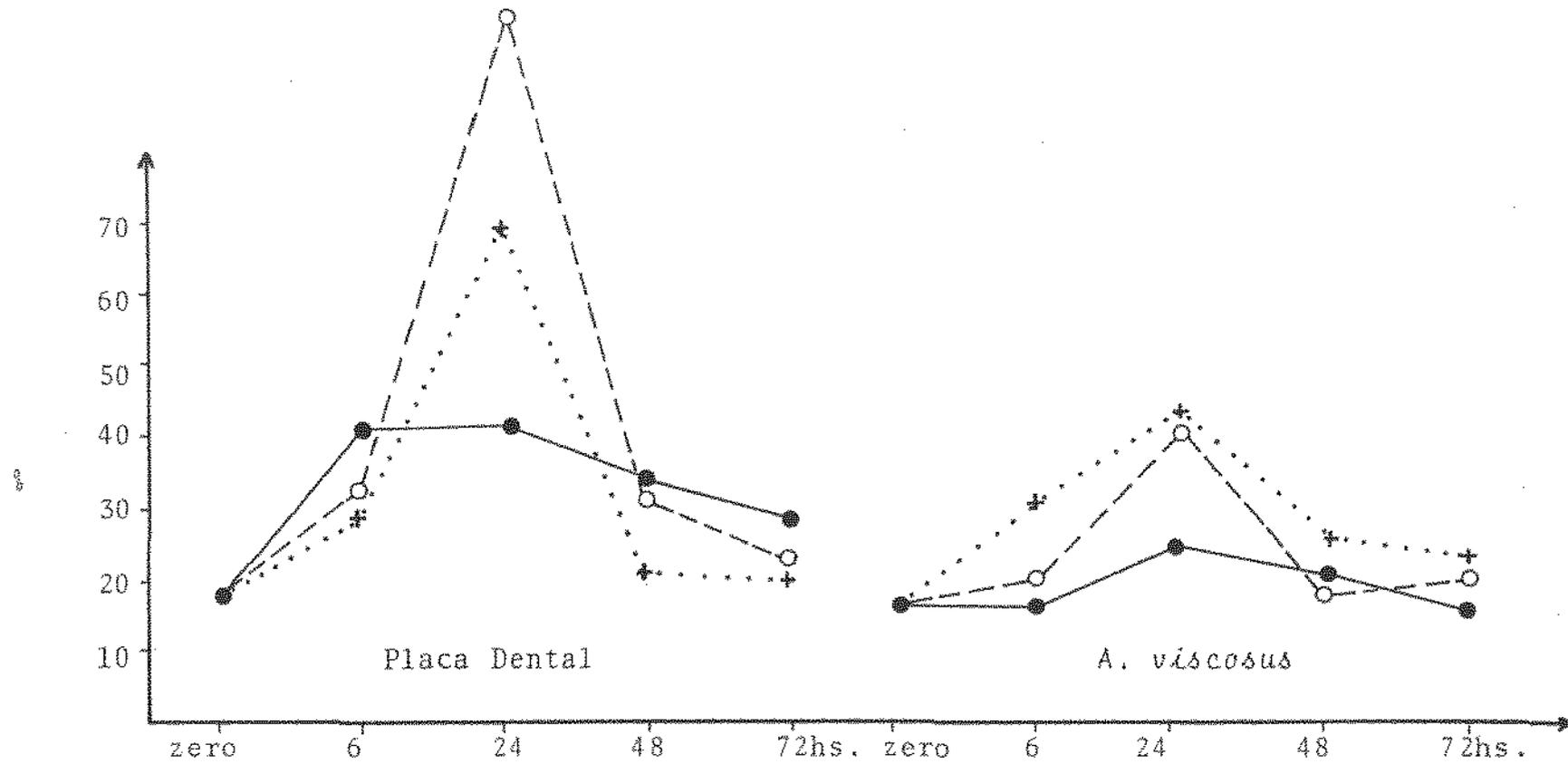


Figura 17- Concentração de complemento (C), albumina e imunoglobulinas (Ig) no fluido peritoneal de camundongos injetados com 20,0ug de Placa Dental e 50,0ug de *A. viscosus*.

Ig ●——●
 C ○---○
 Albumina +.....+

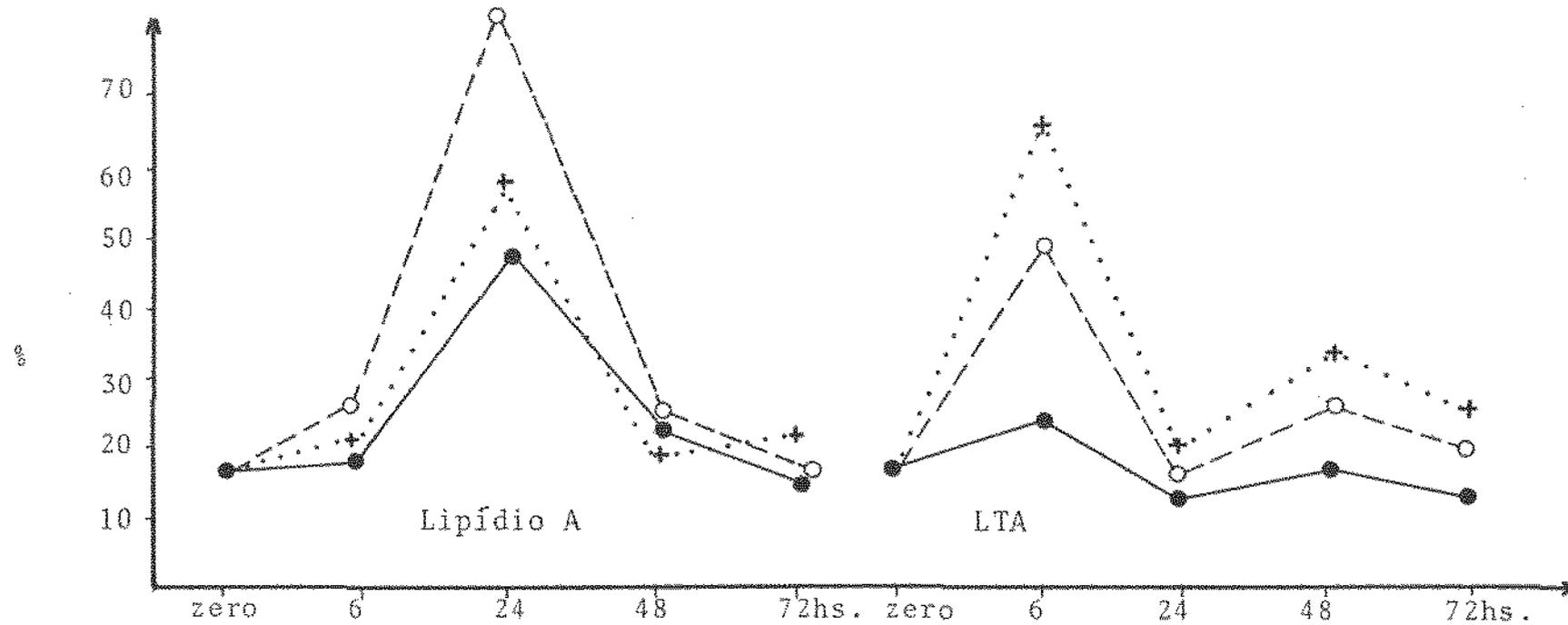


Figura 18 - Concentração de complemento (C), albumina e imunoglobulinas (Ig) no fluido peritoneal de camundongos injetados com 5,0ug de Lipídio A e 50,0ug de Ácido Lipopotei-
côico (LTA).

Ig ●——●
 C ○---○
 Albumina +.....+

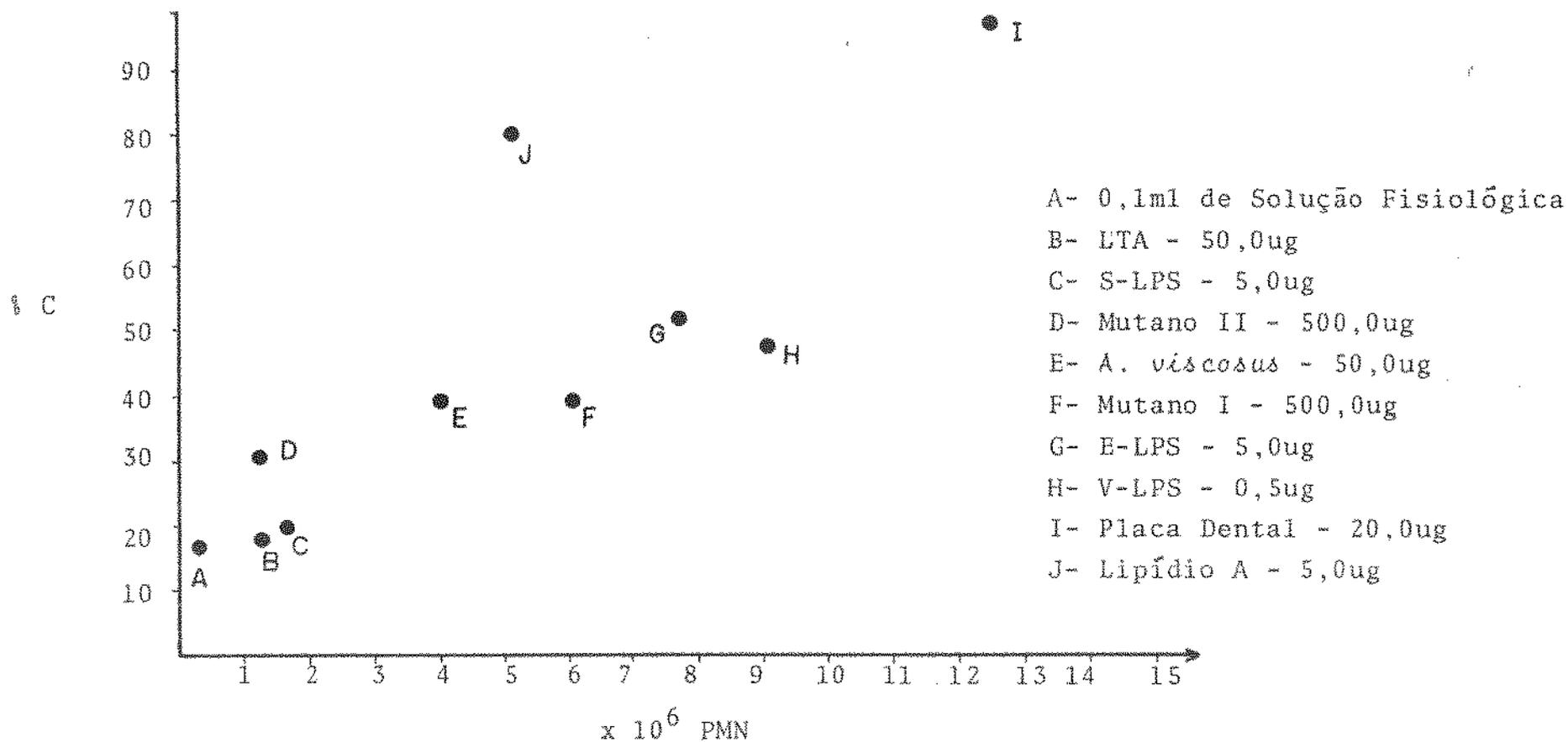


Figura 19- Concentração de complemento (C) e número de PMN no fluido peritoneal, 24 horas após a administração de 0,1ml da substância testada no peritônio de camundongo.

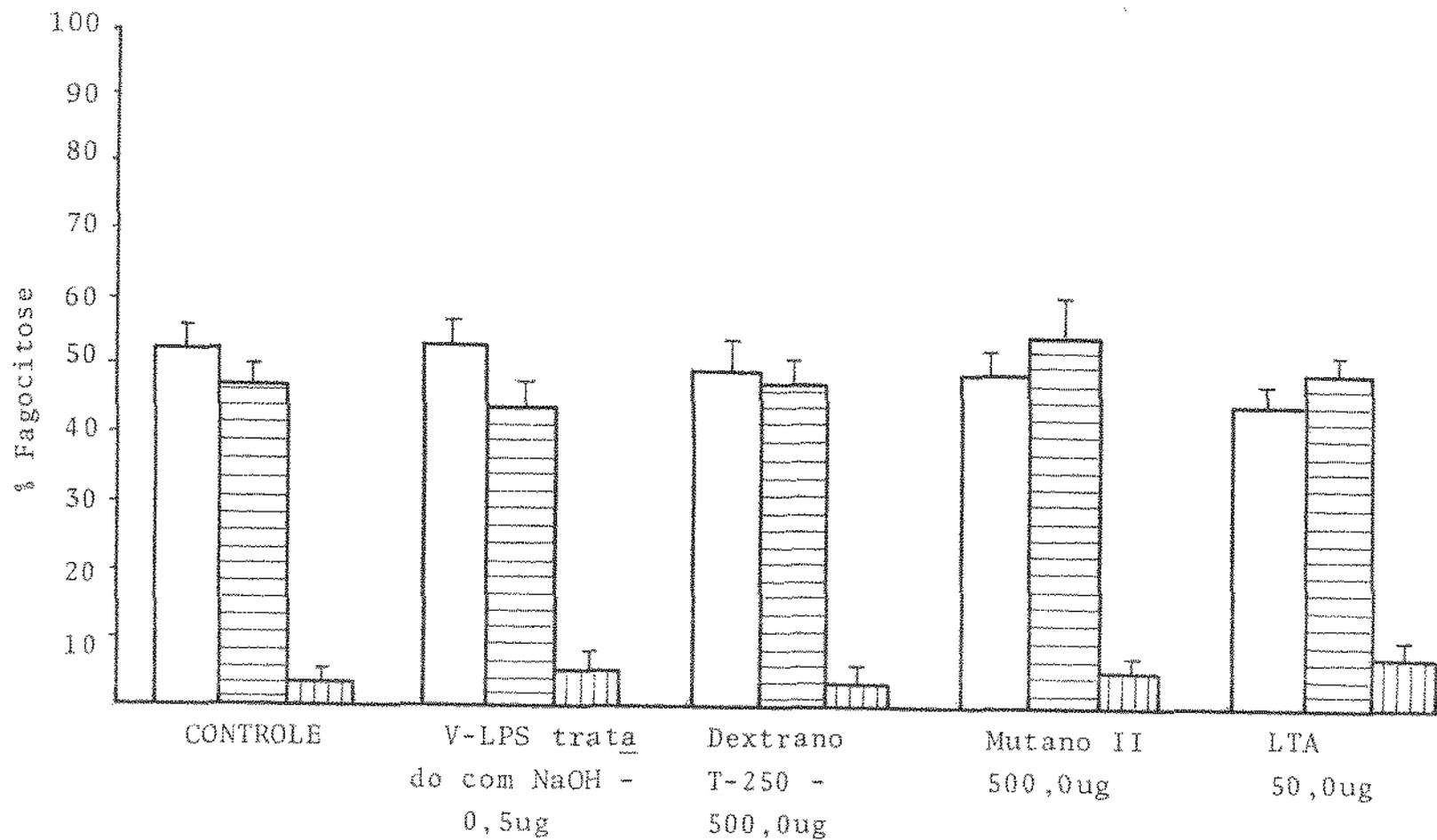


Figura 20- Fagocitose de *Candida albicans*, opsonizadas com soro de camundongo, por macrófagos coletados do peritônio 72 horas após a injeção intraperitoneal da substância a ser testada.

células que não fagocitaram
 células que fagocitaram de 1 a 3 partículas de CA
 células que fagocitaram 4 ou + partículas de CA

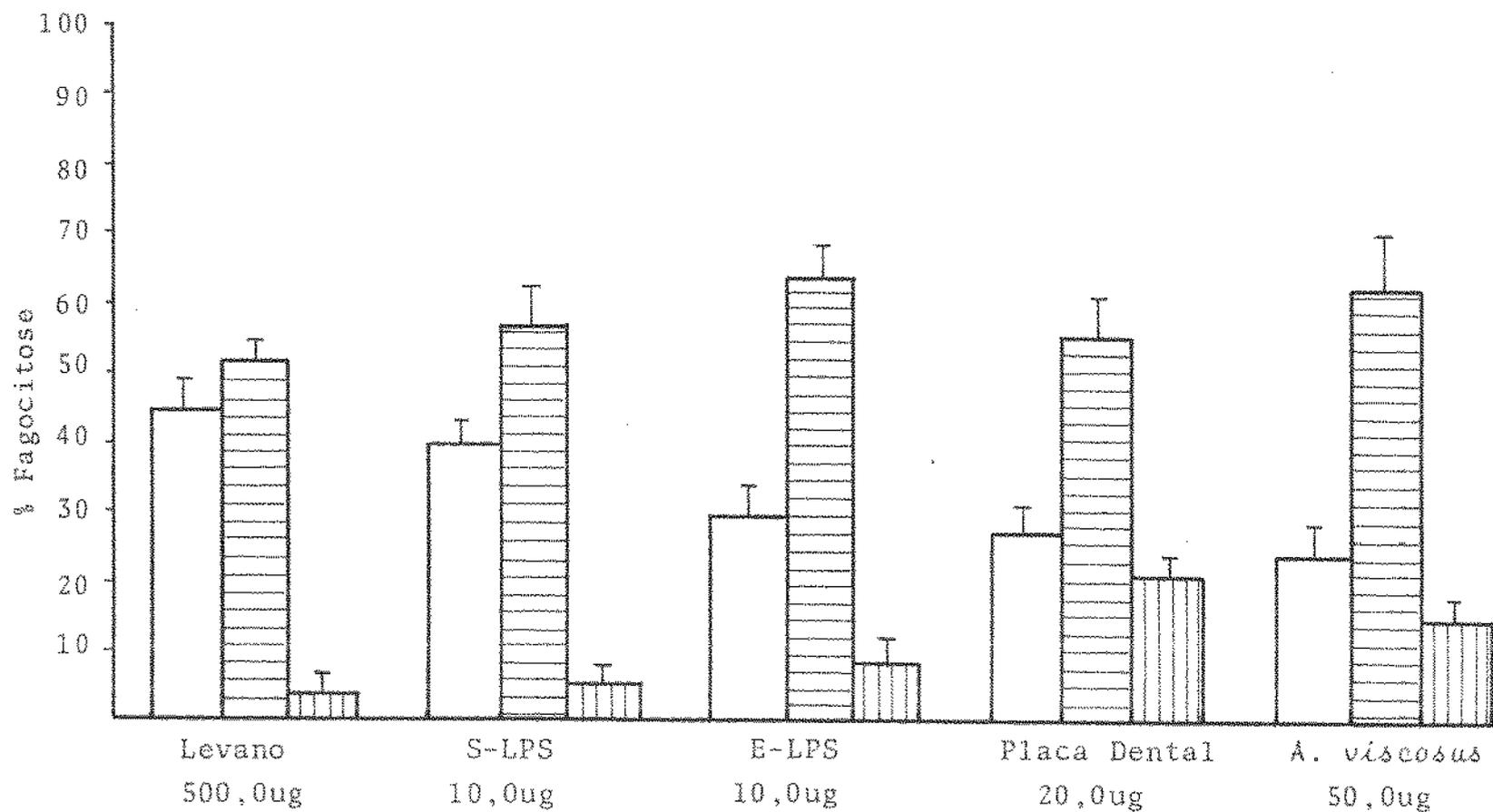


Figura 21- Fagocitose de *Candida albicans*, opsonizadas com soro de camundongo, por macrófagos coletados do peritônio 72 horas após a injeção intraperitoneal da substância a ser testada.

células que não fagocitaram 
 células que fagocitaram de 1 a 3 partículas de CA 
 células que fagocitaram 4 ou + partículas de CA 

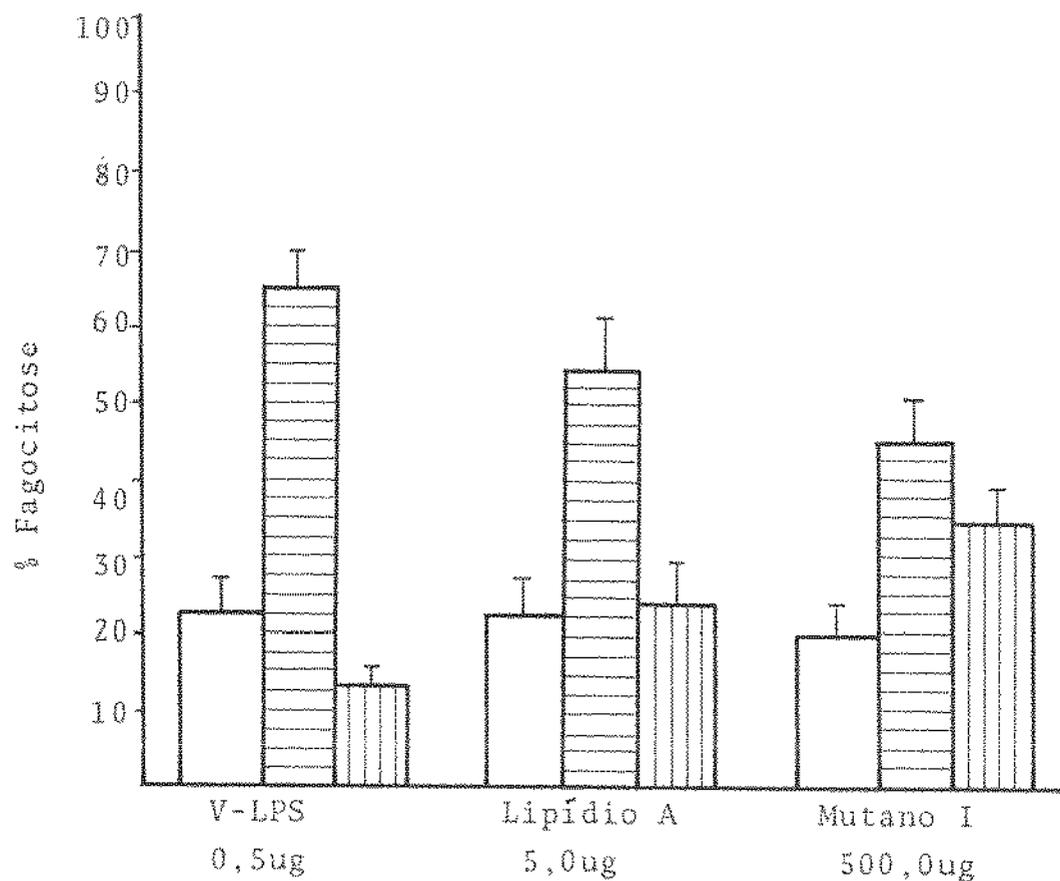


Figura 22- Fagocitose de *Candida albicans*, opsonizadas com soro de camundongo, por macrófagos coletados do peritônio 72 horas após a injeção intraperitoneal da substância a ser testada.

células que não fagocitaram
 células que fagocitaram de 1 a 3 partículas de CA
 células que fagocitaram 4 ou + partículas de CA

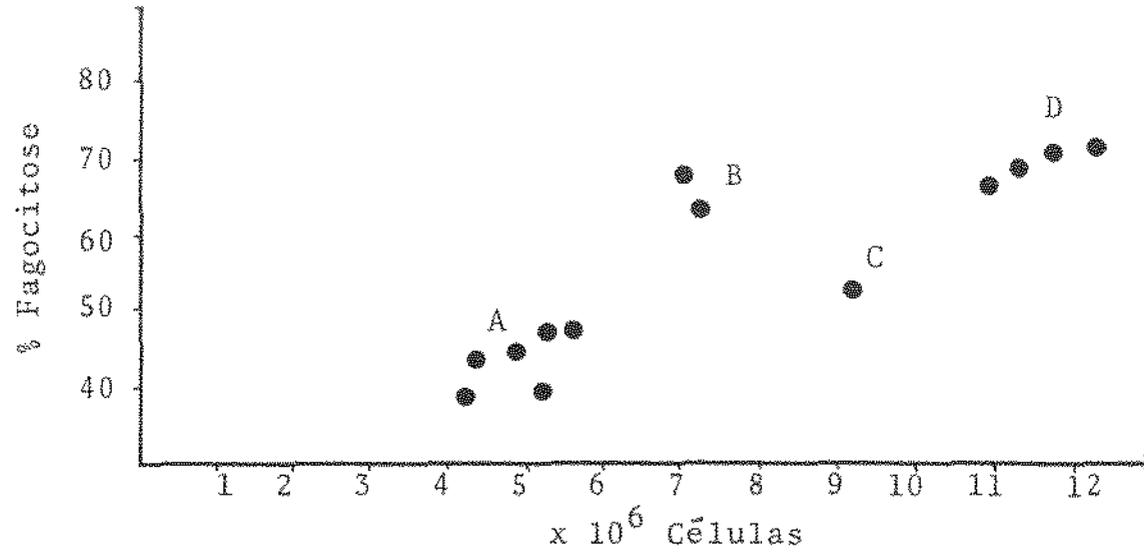


Figura 23- Quantidade de células inflamatórias presentes na cavidade peritonial, 72 horas após a injeção das diversas substâncias testadas e a porcentagem de células que fagocitaram partículas de CA *in vitro*.

A- Solução Fisiológica-	0,1ml	B- E-LPS	- 5,0ug	C- S-LPS-	50,0ug	D- V-LPS	- 0,5ug
V-LPS Desacetilado -	0,5ug	A. viscosus-	50,0ug			Placa Dental-	20,0ug
Dextrano	- 500,0ug					Lipídio A	- 5,0ug
Mutano II	- 500,0ug					Mutano I	- 500,0ug
Levano	- 500,0ug						
LTA	- 50,0ug						

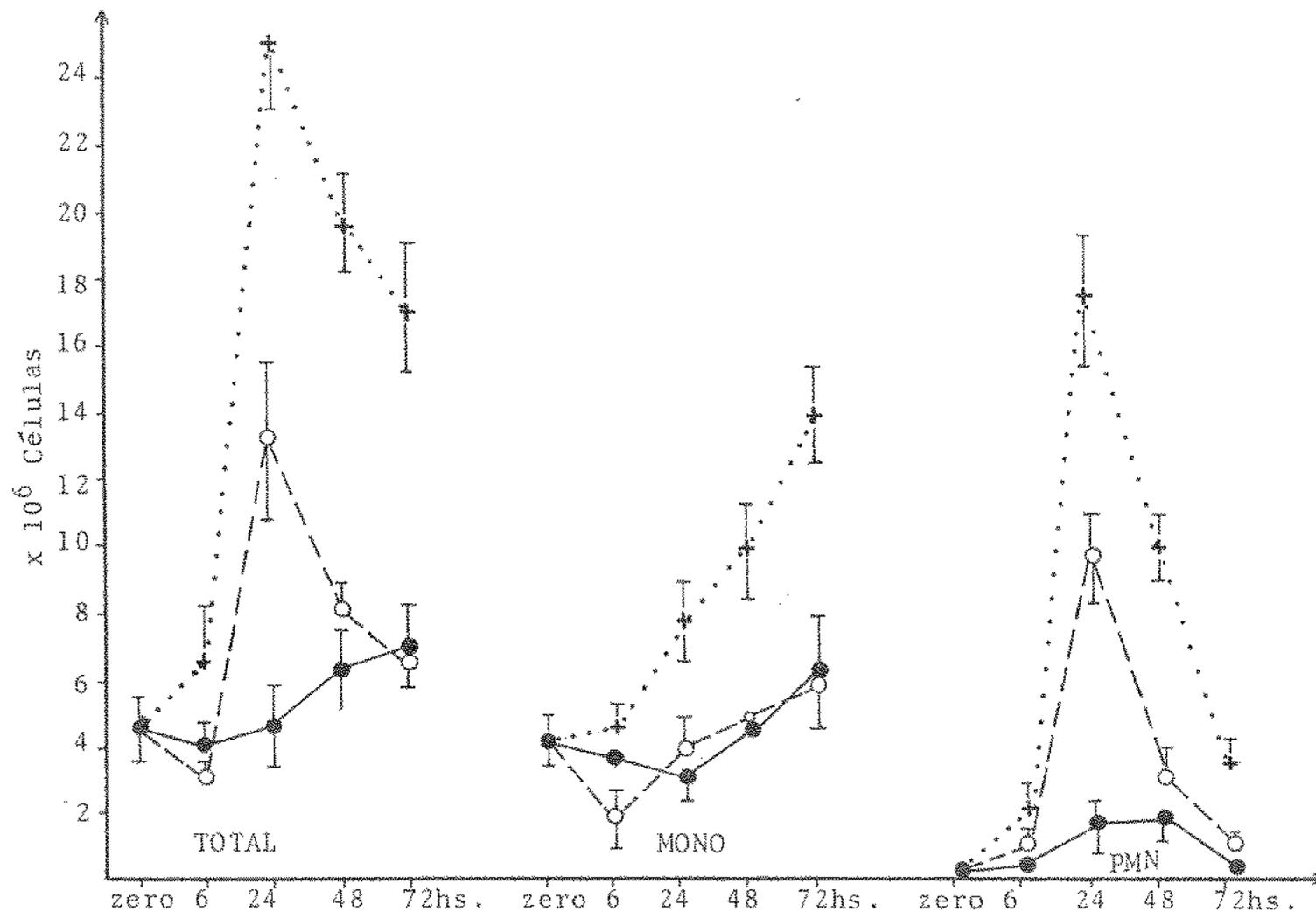


Figura 24- Cinética da resposta inflamatória no peritônio de camundongos 6, 24, 48 e 72 horas após a administração, na cavidade peritoneal, de 5,0ug de V-LPS, E-LPS e S-LPS.

V-LPS +.....+
 E-LPS O---O
 S-LPS ●---●

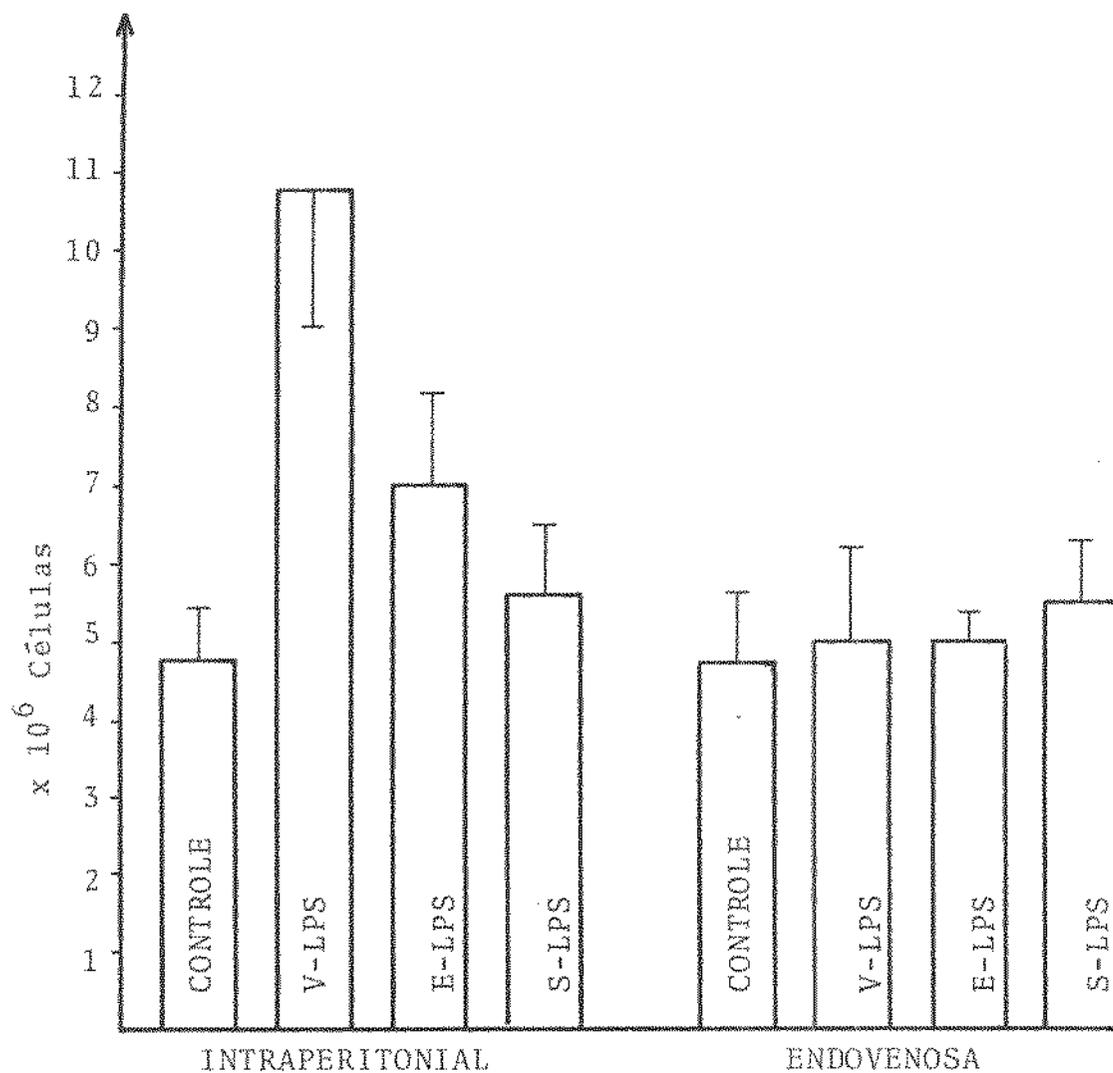


Figura 25- Total de células no peritônio de camundongos 7 dias após a administração intraperitoneal ou endovenosa de 10,0ug de V-LPS, E-LPS ou S-LPS. As células presentes eram quase que exclusivamente mononucleares.

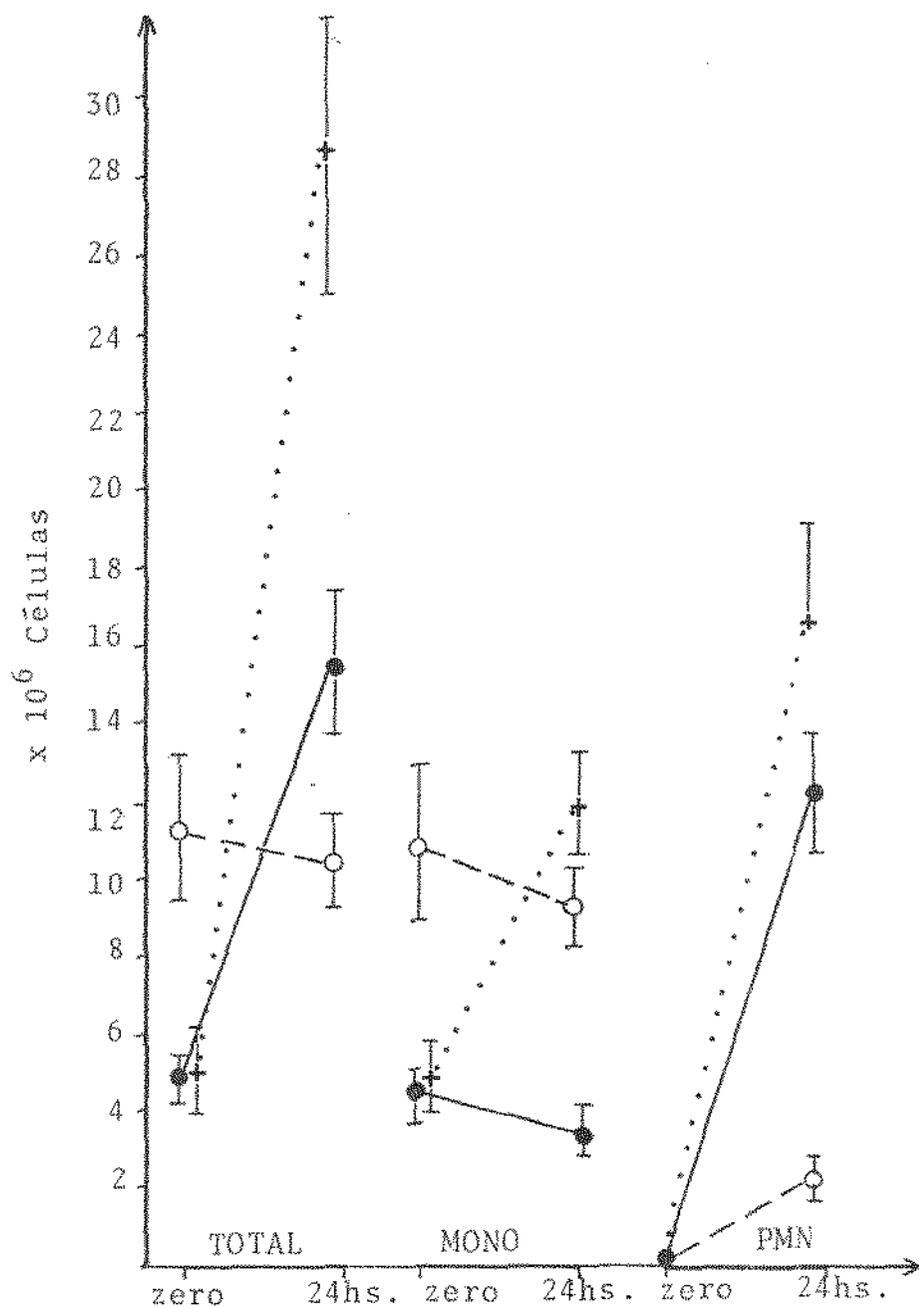


Figura 26- Acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos 24 horas após a injeção intraperitoneal de 0,5ug de V-LPS em animais controles (●—●) e pré-tratados 7 dias antes do teste com 10,0ug do V-LPS intraperitonealmente (○---○) e endovenosamente (······+).

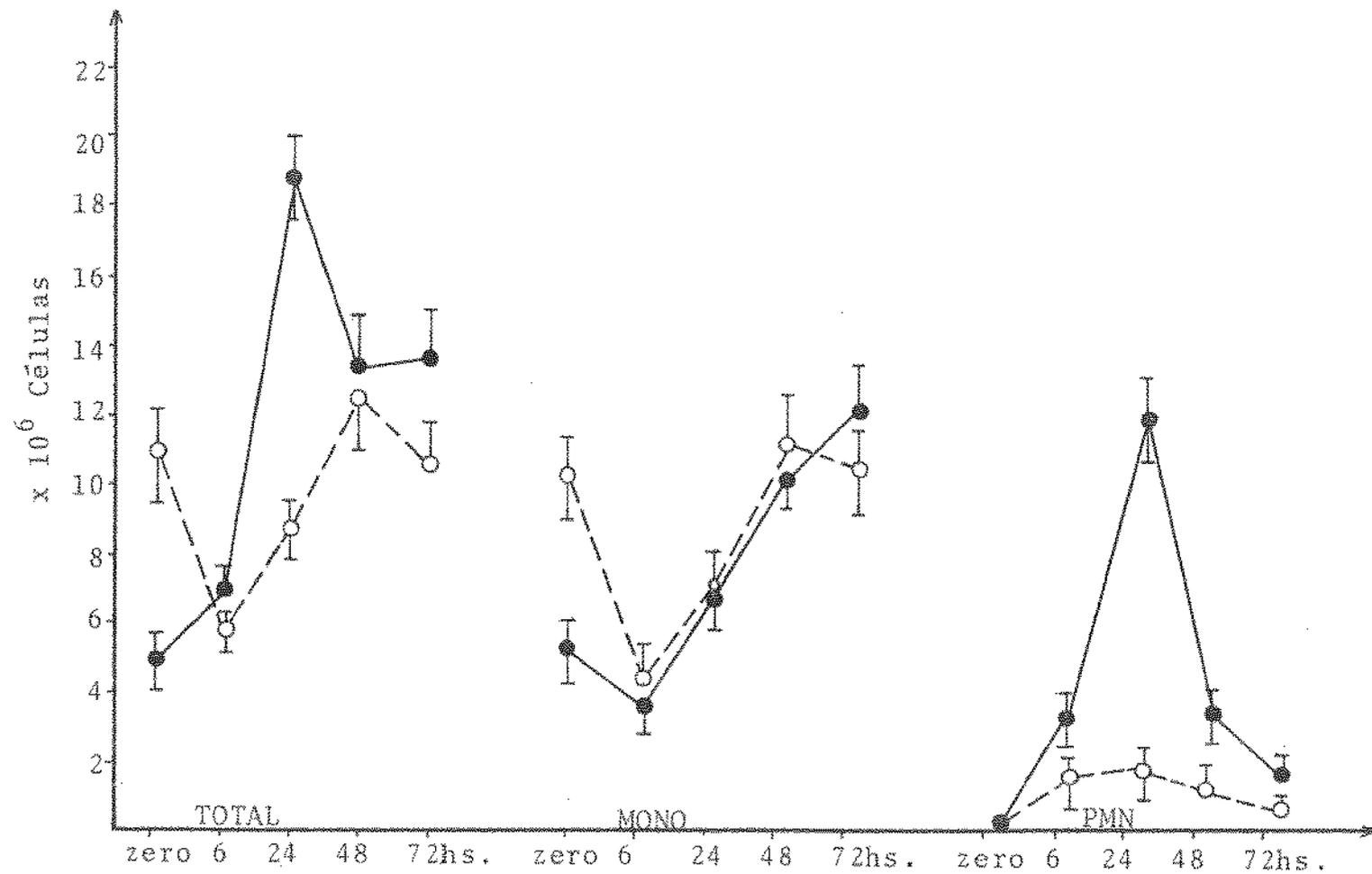


Figura 27- Dinâmica do acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos após a injeção de 0,5ug de V-LPS em animais normais (●—●) e pré-tratados 20 dias antes do teste com 10,0ug de V-LPS intraperitonealmente (○---○).

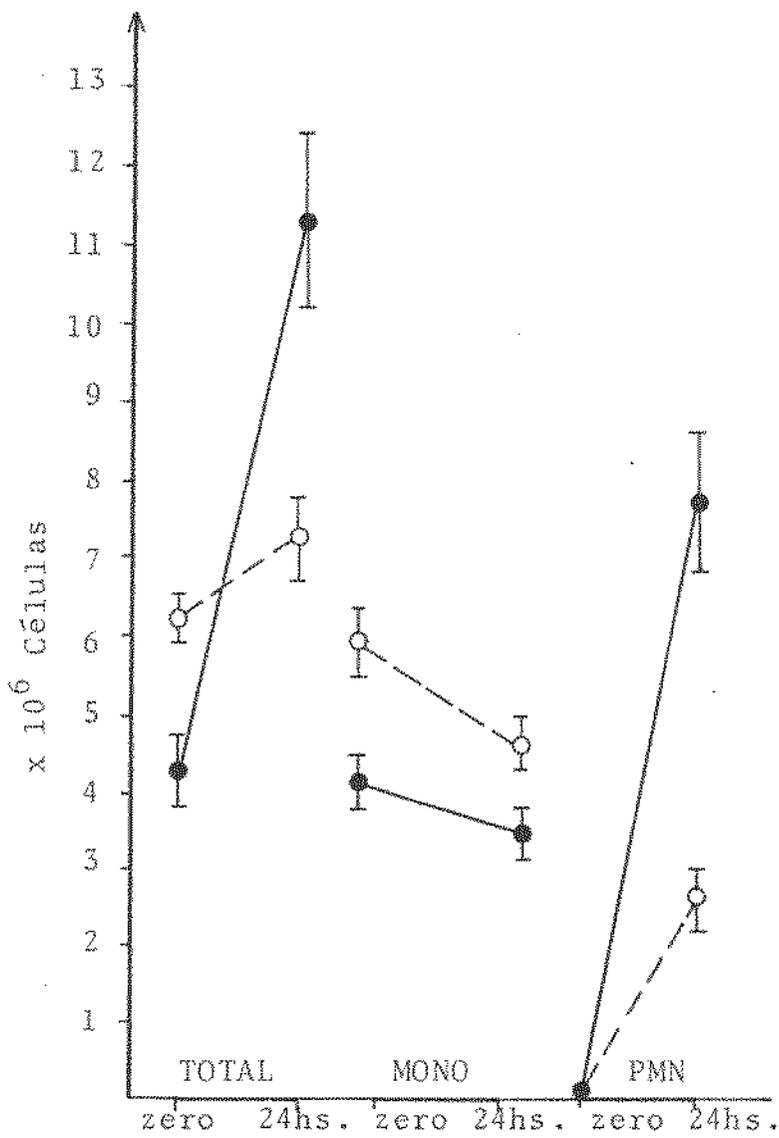


Figura 28- Acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos 24 horas após a administração de 5,0ug de E-LPS em animais normais (●—●) e pré-tratados 20 dias antes do teste com 10,0ug de V-LPS intraperitonalmente (○---○).

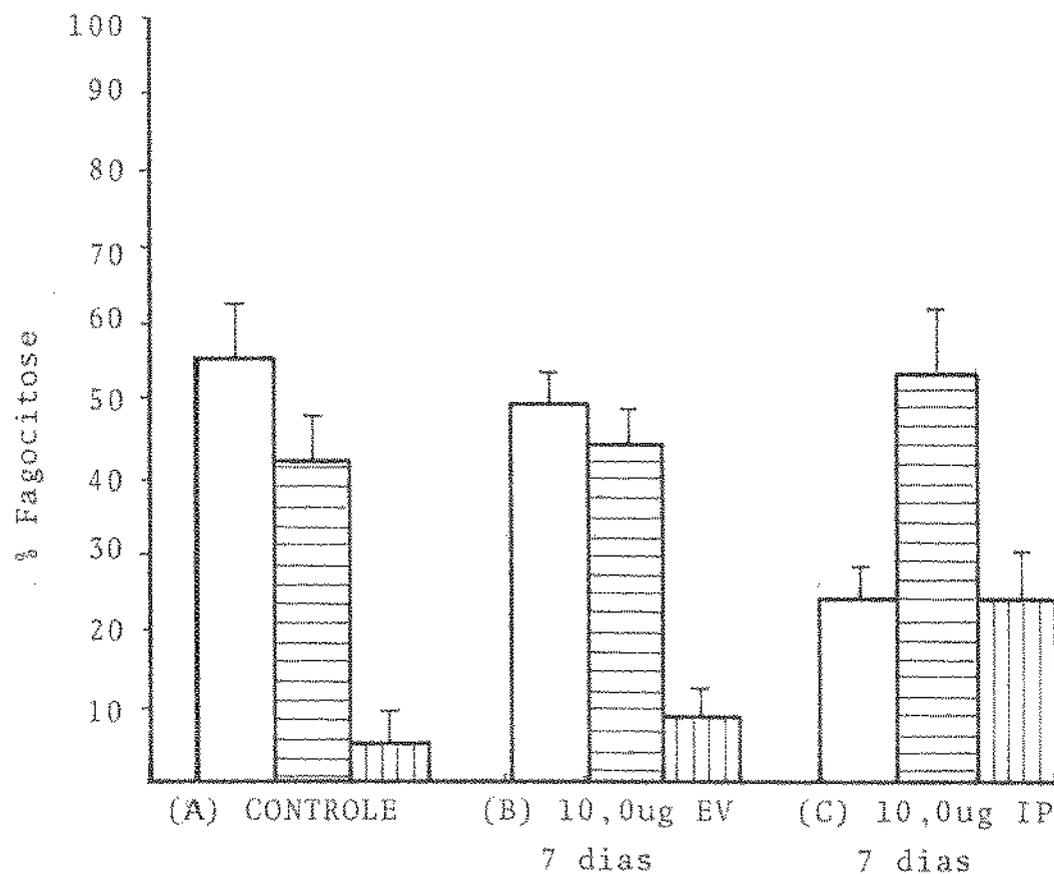


Figura 29- Fagocitose de *Candida albicans* por macrófagos do peritônio de camundongos controles e pré-tratados, 7 dias antes do teste, com 10,0ug de V-LPS intraperitonealmente (IP) ou endovenosamente (EV).

células que não fagocitaram 
 células com 1 a 3 partículas de CA 
 células com 4 ou + partículas de CA 

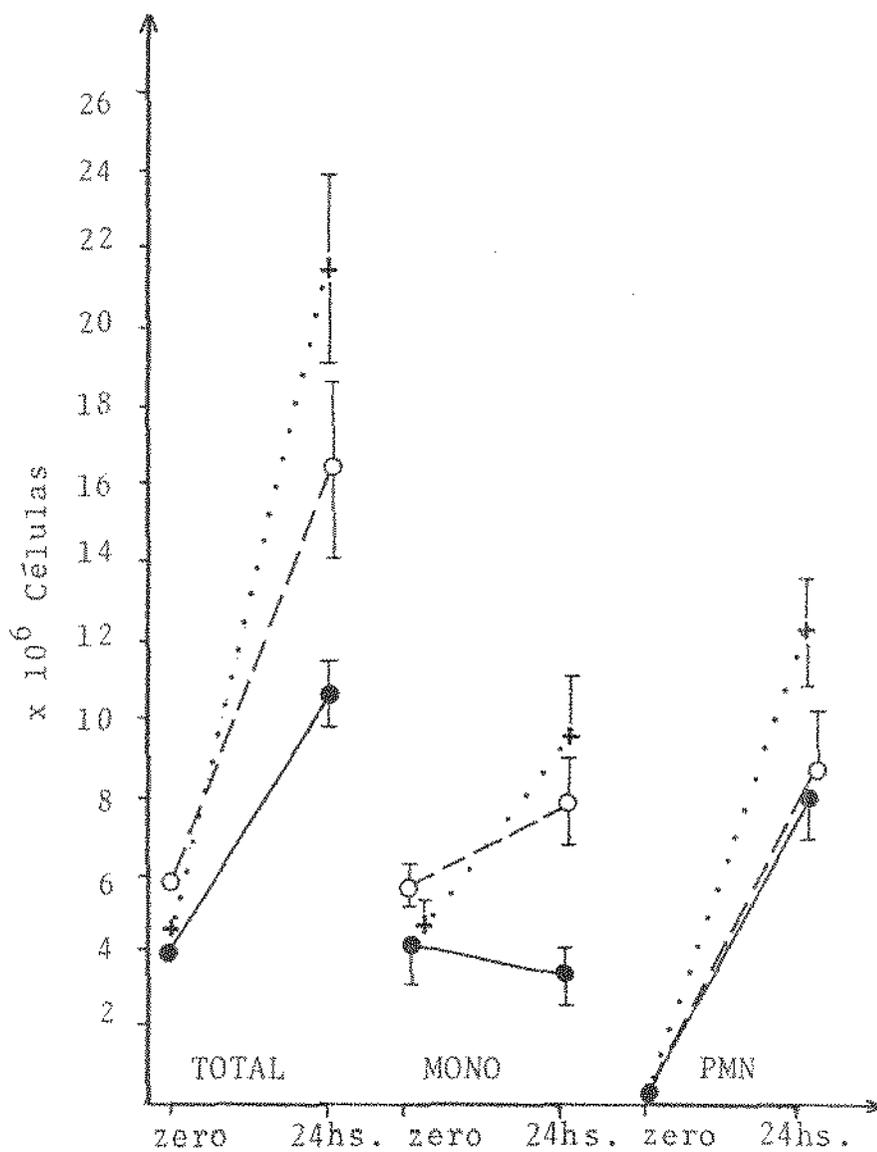


Figura 30- Acúmulo de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos 24 horas após a administração de 5,0ug de E-LPS em animais normais (●—●) e pré-tratados 7 dias antes do teste com 10,0ug de E-LPS intraperitonealmente (○--○) ou endovenosamente (÷.....÷).

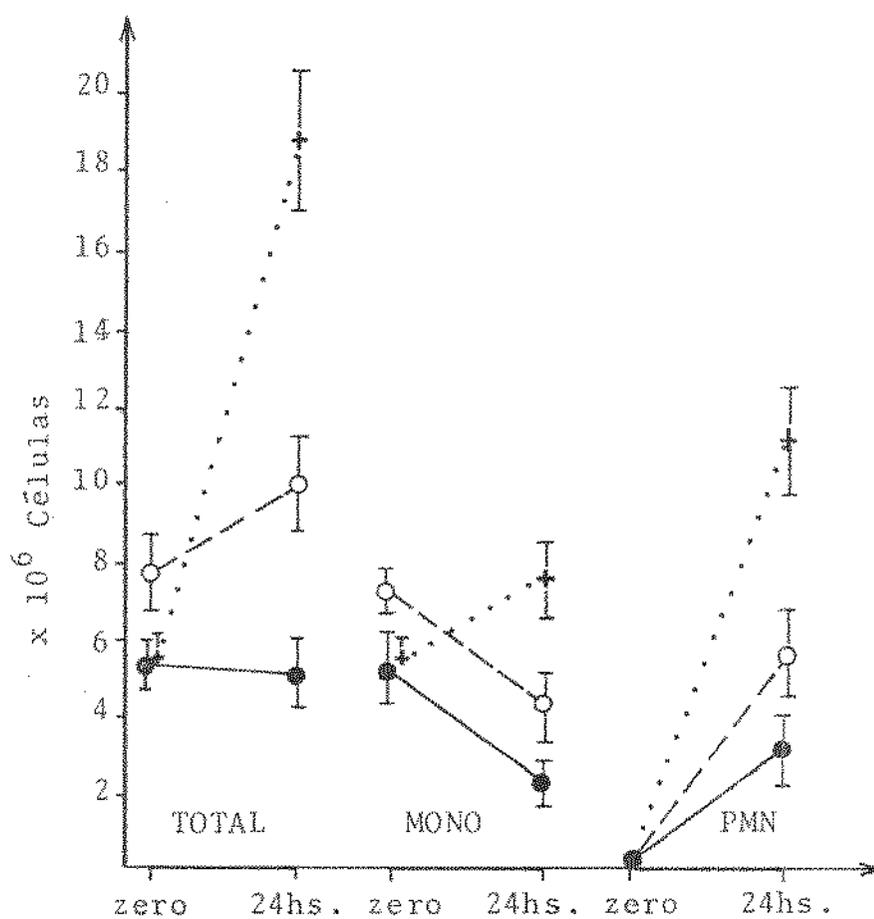


Figura 31- Acúmulo de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos 24 horas após a administração de 5,0ug de S-LPS em camundongos normais (●—●) e pré-tratados 7 dias antes do teste com 10,0ug de S-LPS intraperitonealmente (○---○) ou endovenosamente (+.....+).

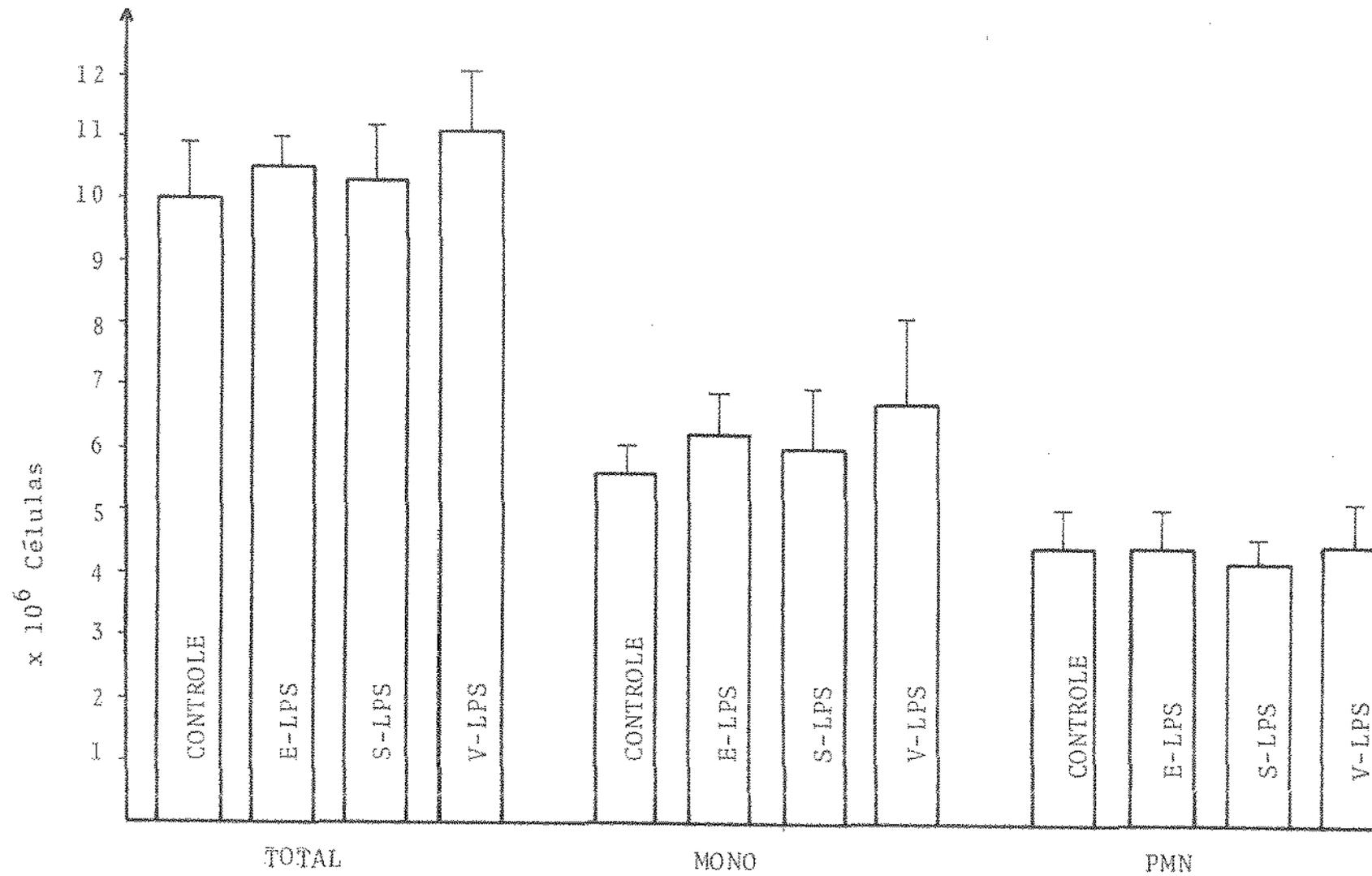


Figura 32- Acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos 24 horas após a administração intra-peritoneal de 50,0ug de *A. viscosus* em animais normais e pré-tratados endovenosamente 7 dias antes do teste com 10,0ug de E-LPS, S-LPS ou V-LPS.

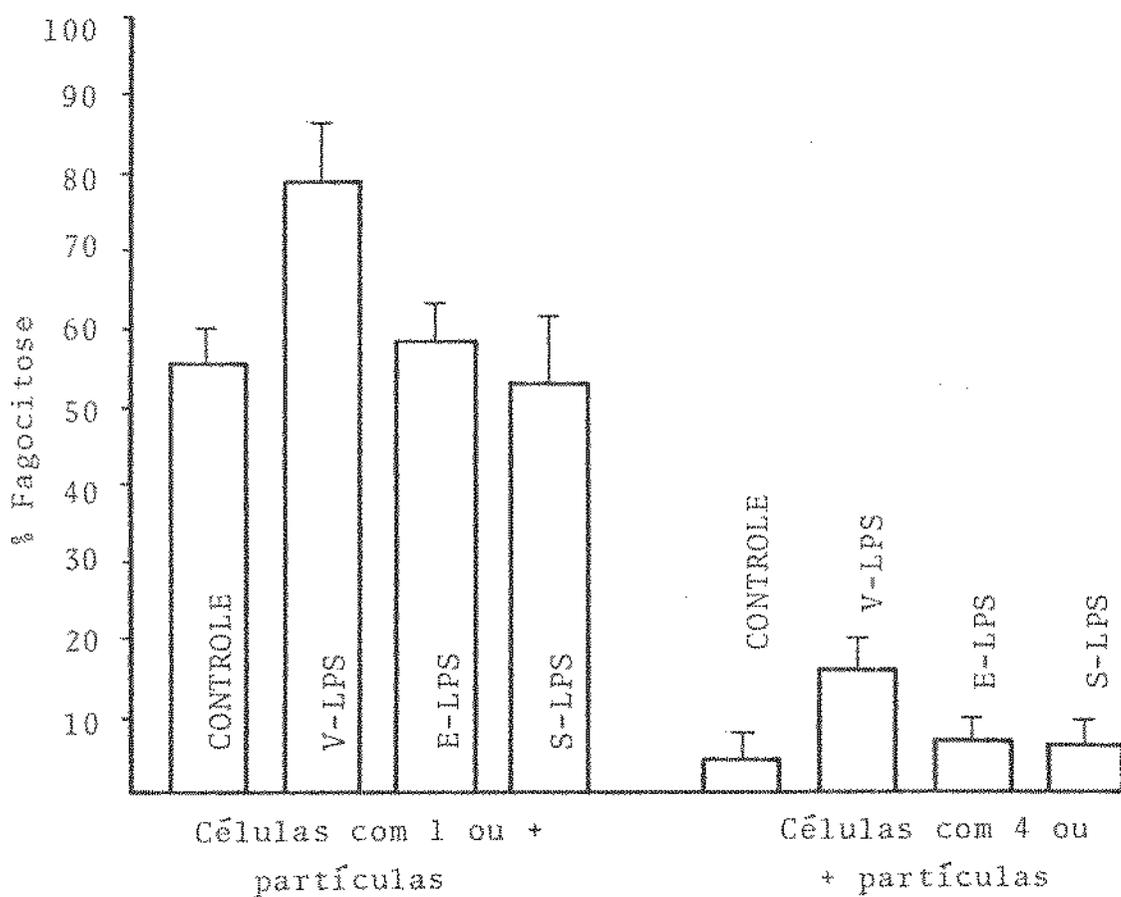


Figura 33- Fagocitose de *Candida albicans* por células peritoneiais de camundongos injetados intraperitonealmente 7 dias antes do teste de fagocitose com 10,0ug de V-LPS, E-LPS ou S-LPS.

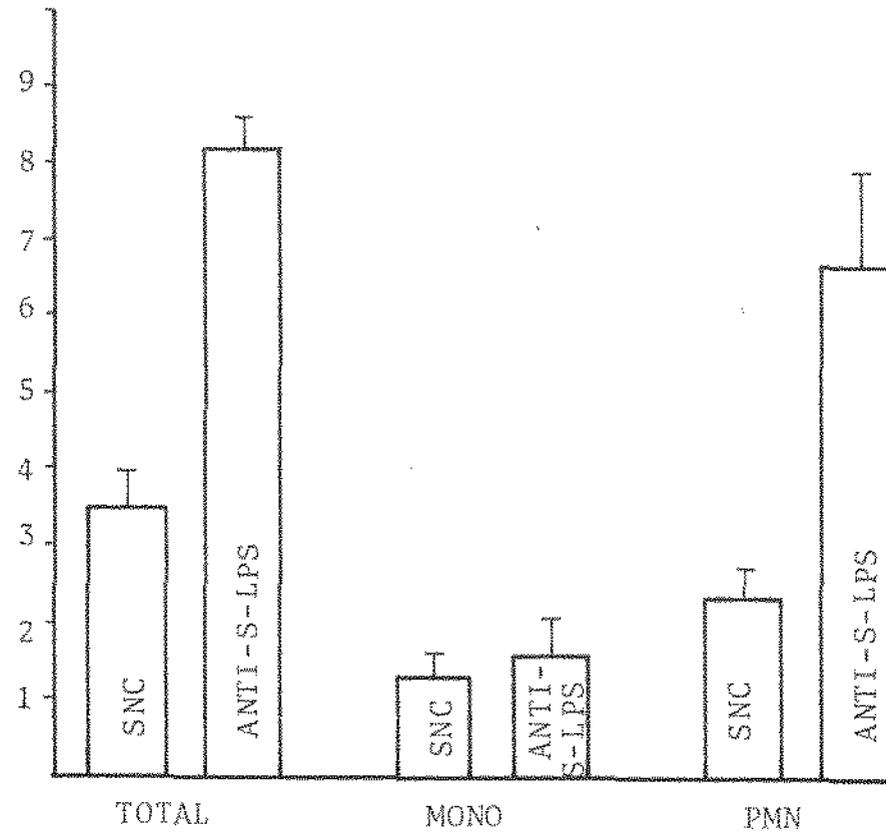


Figura 34- Acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos, 24 horas após a administração intraperitoneal de 5,0ug de S-LPS em animais que receberam endovenosamente 0,2ml de soro de camundongos normais ou imunizados com S-LPS. Os animais que receberam passivamente soro normal não tinham anticorpos contra S-LPS no soro e no fluido peritoneal 30 minutos e 24 horas após a transferência passiva. 30 minutos após a transferência passiva de soro contendo anti-S-LPS, o título no sangue era de 1:512 e 24 horas após a transferência, o título no sangue era de 1:64 e no fluido peritoneal de 1:16.

SNC = animais que receberam 0,2ml de soro normal de camundongo.

ANTI-S-LPS = animais que receberam passivamente Anti-S-LPS.

TABELAS

Tabela 1- Número de células presentes no peritônio de camundongos 6, 24, 48 e 72 horas após a administração, na cavidade peritoneal, de 500,0ug de Dextrano T-250 e Dextrano Sulfatado.

Substância	Célula	Tempo				
		0hs.	6hs.	24hs.	48hs.	72hs.
Dextrano	Total ($\times 10^6$)	4,5 \pm 0,7	4,2 \pm 0,4	4,7 \pm 0,6	4,2 \pm 0,4	4,4 \pm 0,9
	Mono ($\times 10^6$)	4,4 \pm 0,4	4,0 \pm 0,33	4,6 \pm 0,8	4,1 \pm 0,5	4,2 \pm 0,7
	PMN ($\times 10^6$)	0,1 \pm 0,03	0,4 \pm 0,66	0,4 \pm 0,04	0,4 \pm 0,05	0,2 \pm 0,1
Dextrano Sulfatado	Total ($\times 10^6$)	4,5 \pm 0,6	4,3 \pm 0,7	4,3 \pm 0,8	4,4 \pm 0,65	4,6 \pm 0,8
	Mono ($\times 10^6$)	4,4 \pm 0,95	4,0 \pm 0,5	3,15 \pm 0,45	3,5 \pm 0,5	4,0 \pm 0,7
	PMN ($\times 10^6$)	0,1 \pm 0,04	0,4 \pm 0,3	1,1 \pm 0,4	0,85 \pm 0,65	0,5 \pm 0,4

Tabela 2- Efeito da desacetilação do V-LPS e do E-LPS no número de células presentes no peritônio de camundongos 24 horas após a administração intraperitoneal destas substâncias.

Substância	Concentração	Total ($\times 10^6$)	Mono ($\times 10^6$)	PMN ($\times 10^6$)
V-LPS	0,5ug	14,8 \pm 1,7	6,8 \pm 0,8	8,05 \pm 1,1
V-LPS Desacetilado	0,5ug	4,3 \pm 0,3	3,9 \pm 0,4	0,4 \pm 0,25
E-LPS	5,0ug	10,2 \pm 0,6	3,0 \pm 0,4	7,1 \pm 0,7
E-LPS Desacetilado	5,0ug	4,4 \pm 0,8	3,4 \pm 0,5	1,0 \pm 0,4

Tabela 3- Efeito do aquecimento e da desacetilação na capacidade da fração isolada da Placa Dental em causar acúmulo de leucócitos no peritônio de camundongos. A tabela mostra os resultados obtidos com concentração de 20,0ug.

Substância	Total ($\times 10^6$)	Mono ($\times 10^6$)	PMN ($\times 10^6$)
Placa Dental	18,0 \pm 3,4	6,9 \pm 1,8	11,0 \pm 2,9
Placa Aquecida	21,1 \pm 3,3	7,6 \pm 1,2	14,2 \pm 3,6
Placa Desacetilada	7,2 \pm 0,8	4,6 \pm 0,8	2,8 \pm 0,35

Tabela 4- Título de anticorpos específicos no soro e no fluido peritoneal, e número de células formadoras de anticorpos no baço de camundongos injetados endovenosamente ou intraperitonealmente com V-LPS, E-LPS ou S-LPS. Quando foi usada apenas 1 dose de 10,0ug de LPS, o teste foi realizado 7 dias após a injeção. Em animais imunizados com 2 doses de 10,0ug, a segunda foi administrada 3 semanas após a primeira, e o teste realizado depois de 3 dias.

IP- intraperitoneal

EV- endovenosa

CFP- Células formadoras de placa

Substância	Concentração	Via	Título soro	Título fluido peritoneal	CFP/10 ⁷ Células do Baço
V-LPS	10,0ug	IP	0	0	-
V-LPS	10,0ug	EV	0	0	-
V-LPS	2x10ug	EV	0	0	0
E-LPS	10,0ug	IP	1:128	1:8	-
E-LPS	10,0ug	EV	1:64	1:4	-
E-LPS	2x10ug	EV	1:1024	1:128	1520
S-LPS	10,0ug	IP	1:16	1:2	-
S-LPS	10,0ug	EV	1:32	1:8	-
S-LPS	2x10ug	EV	1:2048	1:256	4200

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste trabalho, demonstram que os componentes da placa dental diferem na capacidade de provocar uma reação inflamatória em camundongos. Algumas substâncias como o V-LPS e mutano I foram bastante ativas, enquanto que outras, como o levano, tiveram pequena atividade. O uso da cavidade peritoneal permitiu que uma quantidade relativamente grande de substâncias fossem testadas, e que diversos parâmetros do processo inflamatório, pudessem ser estudados. Na gengiva há uma constante formação de fluido sulcular, que é acompanhada de migração contínua de polimorfonucleares (Attstrom, 1970), enquanto que na cavidade peritoneal não estimulada, o número de PMN é praticamente zero; portanto, qualquer aumento no seu número pode indicar atividade quimiotática da substância testada. Na cavidade peritoneal pode-se injetar facilmente volumes e concentrações bem controladas, e a quantidade de fluido e células presentes permitem que se façam estudos posteriores *in vitro*.

Todos os estudos feitos até agora confirmam a patogenicidade da placa dental nos diferentes modelos usados (MacDonald e cols., 1963; Rizzo e Mergenhagen, 1964; Attstrom e Egelberg, 1971), e a fração isolada da placa dental injetada na cavidade peritoneal, mesmo em baixas doses, foi capaz de mediar uma resposta inflamatória. O tratamento com hidróxido de sódio reduziu apenas em parte esta atividade, indicando que além do LPS, outros princípios ativos estavam presentes. Uma concentração de 200,0ug de placa dental foi menos ativa para a atração de leucócitos durante as primeiras 48 horas, do que o mesmo material 10 vezes menos concentrado. Entretanto, após 72 horas, o número de PMN ainda estava em ascensão, enquanto que com as doses menores já tinha praticamente voltado a níveis normais. Os componentes da placa foram usados isoladamente; entretanto, na placa, eles ocorrem em conjun

to, e para reproduzir o efeito da placa dental, seria necessário o estudo das associações das diversas substâncias, visto que algumas podem agir como adjuvantes.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura, mostrando que os LPS são potentes mediadores da inflamação, causando uma rápida migração de PMN, e diminuição inicial e subsequente aumento de mononucleares (Fruhman, 1964). Os mecanismos pelos quais o LPS causa diminuição das células mononucleares na cavidade peritoneal ainda são desconhecidos. A atividade quimiotática do LPS *in vitro* e *in vivo* depende da ativação do complemento e formação de C5a (Snyderman e cols., 1971; Snyderman, 1973), e embora houvesse aumento na quantidade de complemento na cavidade peritoneal, coincidindo com os PMN, é possível que outros mecanismos estejam operando. A substituição de PMN por mononucleares pode ser devida em parte à liberação de enzimas dos PMN, capazes de atuar sobre C5, gerando fatores quimiotáticos (Wright e Gallin, 1975). Entretanto, quando aumentou a migração das mononucleares, especialmente após 48 horas, a quantidade de albumina e complemento já havia voltado ao normal. Um pequeno número das células mononucleares pode ter-se originado da ação mitogênica do LPS sobre os linfócitos B (Peavy e cols., 1973).

Os três LPS usados variaram na capacidade de provocar inflamação no peritônio. O S-LPS que foi o menos ativo, apresentou uma toxicidade *in vivo* muito intensa e causou significativa redução das células mononucleares do peritônio, quando usado em dose de 50,0ug. Apesar da toxicidade deste LPS aparentemente ter sido uma das razões para a pequena migração celular, quando doses mais baixas foram usadas, o desaparecimento das mononucleares foi menos intenso, mas o número de PMN não aumentou, indicando que este LPS tem uma baixa capacidade quimiotática. Por outro lado, o V-LPS obtido de um microorganismo presente na cavidade oral, cau-

sou reação inflamatória intensa, mesmo a uma concentração de 0,5 ug, sendo que a fração lipídica da molécula foi a responsável por sua atividade. Parece haver uma correlação entre a toxicidade do LPS, e a capacidade de causar migração celular. O V-LPS foi o mais ativo para a migração celular, e ao mesmo tempo pouco tóxico. Segundo Mergenhagen e Jensen (1962), os camundongos são extremamente resistentes à dose letal deste LPS. A correlação entre resistência do animal e migração leucocitária, também ocorre com os camundongos C3H/Hej, que são resistentes aos efeitos do LPS, mas apresentam uma resposta celular aumentada, em relação aos camundongos comuns (Moeller e cols., 1978).

O LTA não apresentou atividade intensa neste sistema. Entretanto, uma dose de 50,0ug, causou migração de PMN durante as primeiras 6 horas, indicando que o LTA é capaz de provocar migração rápida de PMN. Esta atividade do LTA, apesar de pouco intensa, pode ser importante no início do desenvolvimento da doença periodontal, visto que as primeiras bactérias a formarem a placa dental são Gram-positivas, e a fase inicial da doença se caracteriza pelo acúmulo de PMN (Page e Schroeder, 1976). O LTA injetado diretamente na gengiva de rato provocou intensa migração de PMN e reabsorção óssea (Bab e cols., 1979) entretanto, a dose utilizada foi de 300,0ug, e o volume de 0,1ml, que são relativamente grandes para aplicar-se diretamente no tecido gengival do rato.

O levano e o dextrano não foram capazes de provocar inflamação, mesmo na dose de 500,0ug, sendo que o levano foi tóxico para as mononucleares nas primeiras 6 horas. A sulfatação do dextrano não aumentou sua capacidade inflamatória, e embora estas substâncias estejam presentes na placa dental, provavelmente não estão envolvidas diretamente na migração celular. Entretanto, o levano pode causar a proliferação de linfócitos B, e potencializar a transformação blástica provocada pela *Veillonella alcalescens*

(Ivanyi, 1977). O dextrano, além da ação mitogênica sobre os linfócitos, pode acelerar a reabsorção óssea (Johnson, 1975), e induzir a liberação de enzimas lisossômicas (Schorlemmer e cols., 1977), indicando que possui outras atividades que podem ser importantes na doença periodontal.

O *A. viscosus* é um dos componentes importantes da placa dental, e está sempre correlacionado com a doença periodontal (Loesche e Syed, 1978). Engel e cols. (1976) verificaram que o *A. viscosus* é capaz de atrair PMN *in vivo* e *in vitro*, e a fração por nós usada no peritônio provocou acúmulo de PMN a partir das 6 horas, acúmulo esse que continuou aumentando até às 24 horas, enquanto que o LTA teve atividade maior às 6 horas, e o LPS às 24 horas.

Dos dois mutanos usados, o rico em ligações α -1-3 foi o mais potente na indução da migração celular, especialmente PMN. A introdução de 10% de ligações α -1-6 provocou uma redução nessa atividade, mas a diminuição de mononucleares nas primeiras 6 horas ainda estava presente. Parece haver relação entre a capacidade inflamatória desta substância e a proporção de ligações α -1-3 e α -1-6 presentes. O mutano com ligações α -1-3 é o que predomina na matriz da placa (Hotz e cols., 1972), podendo alcançar altas concentrações nas áreas adjacentes à gengiva. Os *Streptococcus mutans* são importantes componentes da placa, e estes resultados indicam que os produtos resultantes destas bactérias podem exercer efeitos inflamatórios na gengiva.

Houve uma correlação entre as propriedades das substâncias em provocarem migração celular e aumento de fagocitose. Assim sendo, a ativação celular poderia ocorrer com qualquer agente flogístico, e ser apenas uma consequência da própria inflamação. Entretanto, sabe-se que substâncias como o LPS podem atuar diretamente sobre os macrófagos, ou através de linfocinas liberadas pe-

los linfócitos B (Wilton e cols., 1975). Além disso, o *A. viscosus* provocou maior atividade fagocitária do que o esperado, pelo número de células presentes no exsudato. De uma maneira geral, quando a substância causou aumento da fagocitose, tanto a porcentagem de células capazes de fagocitarem, como o número de partículas de CA fagocitadas por cada célula estavam aumentados.

Independentemente do mecanismo envolvido, não se sabe se as células com fagocitose aumentada são os macrófagos residentes ativados, as células que migraram durante a inflamação ou ambas. Os experimentos usando-se a desacetilação de LPS confirmaram as observações de Wiener e cols. (1965), de que o lipídio A da fração do LPS é o responsável pela ativação dos macrófagos.

A capacidade de alguns componentes da placa dental em ativar macrófagos pode ser importante na evolução da doença periodontal, tanto no mecanismo de proteção como no de destruição. O LPS, por exemplo, é capaz de aumentar a reabsorção óssea (Hausmann e cols., 1970). O V-LPS, após uma única administração, foi capaz de provocar aumento de fagocitose por tempo longo, o mesmo podendo ocorrer no periodonto, onde esta substância pode ser difundida constantemente da placa para os tecidos. Por outro lado, o E-LPS e o S-LPS, embora tivessem provocado nos primeiros dias um aumento da fagocitose, depois de 7 dias perderam esta atividade. O LPS ativa os macrófagos, alterando não só a fagocitose, mas também os níveis de enzimas lisossômicas (Allison e cols., 1973) e este pode ser um mecanismo pelo qual o LPS, e outros componentes da placa, causariam dano tecidual. Uma das enzimas sintetizadas e liberadas pelos macrófagos é a colagenase (Mergenhagen e cols., 1976). Os macrófagos estão presentes na doença periodontal (Schroeder, 1977; Walker, 1977). No presente trabalho os resultados indicam que suas atividades podem ser moduladas principalmente pelo V-LPS, mutano I e *A. viscosus*, dentre as substâncias testadas.

Com a maior parte das substâncias usadas, houve paralelismo entre a migração de PMN e o extravasamento de complemento e albumina. Os níveis de imunoglobulinas não acompanharam aqueles de complemento e de albumina, com exceção dos testes feitos com o lipídio A, que às 24 horas, teve um máximo de Ig coincidente com o máximo de C e de albumina. O aumento de mononucleares, que em geral ocorreu após as primeiras 24 horas, foi acompanhado de diminuição de proteínas plasmáticas no peritônio, indicando que durante a migração destas células, não há saída concomitante de plasma. Na cavidade peritonial, a migração de PMN é seguida pelo acúmulo de mononucleares, enquanto na gengiva há constante diapedese de PMN para o fluido sulcular. Isto ocorre porque no peritônio as condições são diferentes, e a inflamação tem seu curso mais usual, enquanto na gengiva, os agentes inflamatórios da placa estão constantemente presentes.

Os animais pré-tratados endovenosamente ou intraperitonealmente com E-LPS ou S-LPS apresentaram, 24 horas após o desafio, resposta inflamatória maior que os controles. Este aumento foi mais evidente com o S-LPS, visto que esta substância causa pequena migração de leucócitos em camundongos controles, e qualquer aumento na resposta inflamatória pode ser facilmente observado. Os animais imunizados com estas substâncias apresentaram altos títulos de anticorpos específicos e células formadoras de anticorpos no baço. A formação de complexos antígeno-anticorpo pode ser uma das explicações para esta resposta aumentada. Os camundongos que receberam anticorpos passivamente, após o desafio tiveram maior número de PMN no peritônio que os controles, enquanto que nos imunizados ativamente, tanto as mononucleares como os PMN estavam aumentados.

Usando-se o V-LPS não foi possível a detecção de anticorpos circulantes ou células produtoras de anticorpos no baço de

animais imunizados. A ausência de anticorpos contra o V-LPS não deve ser devida a um fenômeno de tolerância. Com doses menores, os mesmos resultados foram obtidos, e Mergenhagen e Jensen (1962) também não conseguiram anticorpos contra este LPS em camundongos. Segundo estes autores, mesmo em coelhos, o V-LPS é um imunógeno fraco. A razão do V-LPS não ser um bom imunógeno deve residir na estrutura do O-polissacarídeo, que em geral é um antígeno potente (Rudbach, 1971). A maior dificuldade de se obter anticorpos contra V-LPS pode também estar relacionada com a extrema resistência dos camundongos à dose letal do V-LPS (Mergenhagen e Jensen, 1962). O mesmo ocorre com os camundongos C3H/Hej, que são resistentes ao LPS, e ao mesmo tempo incapazes de gerar reação humoral a estas substâncias (Watson e Riblet, 1974). Entretanto, a propriedade antigênica depende essencialmente da porção O-polissacarídica, e a toxicidade e a própria atividade quimiotática dependem da fração lipídica do LPS. Embora não se possa eliminar totalmente a possibilidade de que anticorpos foram formados, mas não detectados, os animais pré-tratados com V-LPS reagiram de maneira diferente dos injetados com E-LPS ou S-LPS.

A administração intraperitoneal de 10,0ug de V-LPS, provocou aumento no número e na fagocitose das células do peritônio, que persistiu mesmo após 20 dias. Uma das possíveis explicações para esta resposta crônica é a própria ausência de anticorpos. Os anticorpos devem facilitar a fagocitose e neutralização do LPS, o que explicaria a menor capacidade dos E-LPS e S-LPS em provocarem inflamação mais duradoura, e na ausência das Ig, o LPS atuaria como agente flogógeno por tempo mais longo. Animais pré-tratados no peritônio com V-LPS, quando desafiados, apresentaram resposta inflamatória menor do que os controles. Esta resposta não é específica, desde que os resultados são semelhantes quando o desafio é feito com V-LPS e E-LPS, e estas duas substâncias não se cruzam sorologicamente. Um número aumentado de células no peritônio, e

uma maior capacidade fagocítica destas células quando do desafio, devem contribuir para a neutralização mais rápida de qualquer substância injetada no peritônio, e conseqüentemente a inflamação resultante será menor. De fato, o aumento da capacidade fagocítica do sistema mononuclear fagocitário (SMF) parece ser um dos mecanismos pelo qual o LPS protege camundongos contra subseqüentes infecções experimentais (Wright e cols., 1969). Moeller e cols. (1978) também verificaram que a sobrevivência de camundongos sensíveis ao LPS aumenta, quando o peritônio tem maior número de células.

Por outro lado, a injeção endovenosa do V-LPS não modificou a população da cavidade peritoneal, mas preparou os animais a exibirem de maneira específica, uma resposta celular aumentada, quando do desafio no peritônio. Esta especificidade foi verificada quando o *A. viscosus* causou inflamação de intensidade semelhante nos animais controles e nos pré-tratados endovenosamente com LPS. A leucocitose devida ao LPS, mesmo se presente após 7 dias, não explicaria o aumento de mononucleares, visto que é devida exclusivamente aos granulócitos (Herion e cols., 1965; Chervenick e cols., 1967). A maior parte dos trabalhos sobre o efeito do LPS no SMF foram feitos a intervalos curtos após a administração da substância (Benecerraf e Sebastyen, 1957), enquanto que estes experimentos foram realizados 7 dias após a injeção do LPS; assim sendo é possível que a estimulação inespecífica do SMF tenha desparecido, e portanto não tenha influenciado os resultados. Provavelmente, o LPS aumenta inespecificamente a resistência nos primeiros 2 ou 3 dias, e posteriormente o faz de maneira específica. Isto foi observado por Milner e Rudbach (1968), que pré-tratando coelhos com 3 endotoxinas, verificaram que depois de 24 horas, os animais estavam igualmente tolerantes a uma delas, mas depois de 7 dias, os coelhos estavam tolerantes apenas às usadas na imunização, indicando a ocorrência de especificidade.

O aumento da resposta inflamatória em animais pré-tratados endovenosamente com V-LPS foi bem evidente 24 horas após o desafio, não teve a participação de anticorpos, e consistiu principalmente de células mononucleares. Todas estas características coincidem com a reação imunológica do tipo IV ou retardada. As observações de Mergenhagen e Jensen (1962), de que camundongos pré-tratados com V-LPS apresentam aumento específico da resistência aos efeitos tóxicos deste LPS, também sugerem a participação do sistema imune. De acordo com Nelson e Boyden (1963), cobaias com hipersensibilidade retardada apresentam diminuição do número de mononucleares do peritônio, quando injetadas com o antígeno. Entretanto, Nelson e Boyden observaram este fenômeno 2 a 4 horas após a administração do antígeno, enquanto que no presente trabalho, o aumento no número de células foi observado após 24 horas. É possível que o número de células inicialmente tenha diminuído, aumentando posteriormente. Produtos da *Veillonella alcalescens* são capazes de provocar a transformação blástica de linfócitos de sangue periférico de pacientes com doença periodontal (Ivanyi e Lehner, 1970) indicando a participação do V-LPS na resposta imune do periodonto. Portanto, a possibilidade do V-LPS provocar hipersensibilidade retardada, como sugerem os resultados deste trabalho, merece atenção especial, visto que os mecanismos envolvidos podem estar diretamente relacionados com a patogenia da doença periodontal.

CONCLUSÕES

- 1- A cavidade peritonial de camundongos mostrou-se adequada para o estudo das propriedades inflamatórias da placa dental e de alguns de seus componentes.
- 2- A fração preparada da placa dental foi ativa neste sistema, provocando migração de leucócitos, exsudação de complemento e albumina, e aumento de fagocitose dos macrófagos.
- 3- O tratamento com hidróxido de sódio diminuiu as propriedades inflamatórias da placa dental, enquanto que o aquecimento não modificou suas propriedades flogísticas.
- 4- Dos componentes da placa dental testados, o Lipopolissacarídeo da *Veillonella alcalescens*, Mutano I (mais de 99% de ligações α -1-3), *Actinomyces viscosus*, e o Lipídio A foram os mais ativos em provocar migração celular, aumento de fagocitose e exsudação de complemento e albumina, enquanto o Dextrano, Mutano II (90% de ligações α -1-3 e 10% de α -1-6), Ácido Lipoteicoico e o Levano tiveram menor atividade.
- 5- Observou-se paralelismo entre a migração de PMN e a exsudação de complemento e albumina, e relação entre a capacidade das substâncias de atrair células mononucleares e aumentar a capacidade fagocitária destas células.
- 6- Camundongos pré-tratados com S-LPS e E-LPS apresentaram anticorpos específicos no sangue e no fluido peritonial, e células formadoras de anticorpos no baço. Em animais pré-tratados com V-LPS não foi possível detectar-se anticorpos específicos ou células formadoras de anticorpos.
- 7- Animais pré-tratados endovenosamente com V-LPS apresentaram resposta inflamatória aumentada quando o desafio foi feito na cavidade peritonial, e diminuição da inflamação quando o pré-tratamento foi feito intraperitonealmente.
- 8- Animais pré-tratados endovenosamente ou intraperitonealmente com S-LPS e E-LPS apresentaram resposta inflamatória aumentada quando o desafio foi feito na cavidade peritonial.
- 9- A transferência passiva de anticorpos endovenosamente fez com que os camundongos apresentassem resposta inflamatória aumentada quando o desafio foi feito no peritônio.

RESUMO

Está bem fundamentada a relação entre placa dental e doença periodontal inflamatória. Entretanto, devido à complexidade da estrutura da placa ainda não se sabe quais as bactérias ou substâncias diretamente envolvidas no processo. Como as bactérias normalmente não atravessam a barreira epitelial, a atenção tem sido voltada para os componentes da placa que têm possibilidade de atingir o tecido conjuntivo subjacente. No presente trabalho foi utilizado como modelo experimental a cavidade peritoneal de camundongos, que se mostrou eficiente para o estudo das propriedades inflamatórias da placa dental e de alguns de seus componentes.

Inicialmente foi feito um estudo comparativo da capacidade da placa dental e de alguns de seus componentes em provocar migração leucocitária, extravasamento de material plasmático (complemento, albumina e imunoglobulinas), e aumento da fagocitose de macrófagos. A fração preparada da placa dental foi ativa neste sistema, e o tratamento com hidróxido de sódio diminuiu suas propriedades inflamatórias. Das substâncias isoladas, as mais potentes foram o lipopolissacarídeo da *Veillonella alcalescens*, o Mutano I (com mais de 99% de ligações α -1-3), a fração solúvel do *Actinomyces viscosus* e o Lipídio A, enquanto que o Dextrano T-250, o Mutano II (90% de α -1-3 e 10% α -1-6), o Ácido Lipoteicóico e o Levano tiveram pouca atividade neste sistema.

Procurou-se também estudar neste modelo, o efeito do pré-tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) na resposta inflamatória. Camundongos pré-tratados intraperitonealmente com os lipopolissacarídeos da *Salmonella typhimurium* (S-LPS) e *Escherichia coli* (E-LPS) apresentaram resposta inflamatória aumentada quando o teste foi feito no peritônio, enquanto que os pré-tratados com LPS derivado da *Veillonella alcalescens* (V-LPS) apresentaram menor número de células, em relação aos controles, quando do desafio. Animais pré-tratados endovenosamente com S-LPS, E-LPS ou V-LPS, mostraram maior número de mononucleares e polimorfonucleares, 24 horas após o desafio no peritônio com as mesmas substâncias. Os animais pré-tratados com E-LPS e S-LPS apresentaram células formadoras de anticorpos e anticorpos específicos no sangue e fluido peritoneal. Com o V-LPS não foram observados resultados semelhantes. A participação das imunoglobulinas nas reações inflamatórias causadas pelo LPS foi estudada através da transferência passiva de anticorpos.

SUMMARY

It is well established that dental plaque plays a fundamental role in the pathogenicity of the inflammatory periodontal disease. Nevertheless, the composition of dental plaque is so complex that until now it is not known which bacteria or substances are involved in this disease. As the microorganisms cannot cross the epithelial barrier, attention has been focused on the extracellular metabolites present in plaque, which could directly damage the periodontal connective tissue. In this work the peritoneal cavity of mice was used to study the inflammatory properties of dental plaque and some of its components.

Initially a comparative study of the capacity of dental plaque and its constituents to provoke leukocyte migration, plasma extravasation (complement, albumine and immunoglobulines), and macrophage activation was made. The dental plaque material was active in this system, and deacetylation with sodium hydroxide decreased its inflammatory properties. Of the isolated substances, the more powerful to elicit an inflammatory response were the lipopolysaccharide from *Veillonella alcalescens*, Mutan I (more than 99% α -1-3 linkages), a soluble extract from *Actinomyces viscosus* and Lipid A, while Dextran T-250, Mutan II (90% α -1-3 and 10% α -1-6 linkages), Lipoteichoic acid and Levan had only a small activity in this model.

The effect of pre-treatment of mice with LPS in the inflammatory response was also studied. Mice injected intravenously or intraperitoneally with LPS derived from *Salmonella typhimurium* (S-LPS), *Escherichia coli* (E-LPS) or *Veillonella alcalescens* (V-LPS) had an increased leukocyte response, when inflammation was induced in the peritoneal cavity with the same substances. The only exception was V-LPS which when injected in the peritoneal cavity caused a chronic inflammation, and a decreased response when the test was done in the peritoneal cavity itself. The pre-treatment with E-LPS and S-LPS, induced the formation of plaque forming cells in the spleen, as well as the presence of specific antibodies in the blood and peritoneal fluid, but this response was not observed with V-LPS. To verify the participation of immunoglobulines in these reactions, we used the passive transfer of antibodies, which also provoked an increased inflammatory response.

ABREVIACÕES USADAS NESTE TRABALHO

A. viscosus	- <i>Actinomyces viscosus</i>
C	- complemento
CA	- <i>Candida albicans</i>
CFP	- células formadoras de placas
E-LPS	- lipopolissacarídeo derivado da <i>Escherichia coli</i>
ev	- endovenosa
Ig	- imunoglobulinas
ip	- intraperitonal
LPS	- lipopolissacarídios
LTA	- ácido lipoteicóico
PMN	- polimorfonucleares
S-LPS	- lipopolissacarídeo derivado da <i>Salmonella typhimurium</i>
SMF	- sistema mononuclear fagocitário
V-LPS	- lipopolissacarídeo derivado da <i>Veillonella alcalescens</i>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEVY, Y.G. & BATTISTO, J.R. Dextran-triggered T cells heighten T-and B- cell reactions to mitogens. Immunology, 30: 379-90, 1976.
- ALFANO, M.C.; CHASEUS, A.T.; MASI, C.W. Autoradiographic study of the penetration of radiolabelled dextrans and inulin through non-keratinised oral mucosa *in vitro*. J. period. Res., 12: 368-77, 1977.
- ALLISON, A.C.; DAVIES, P.; PAGE, R.C. Effects of endotoxin on macrophages and other lymphoreticular cells. J. infect. Dis., 128: 212-9, 1973.
- ALMEIDA, O.P. & BÖHM, G.M. Vascular permeability in the rat gingiva. A model of vessel response in chronic inflammation. J. Path., 127: 27-33, 1979.
- ARREDONDO, M.I. & KAMPSCHMIDT, R.F. Effect of endotoxins on phagocytic activity of the reticuloendothelial system of the rat. Proc. Soc. exp. Biol., 112: 78-81, 1963.
- ATHENS, J.W.; HAAB, O.P.; RAAB, S.O.; MAUER, A.M.; ASHENBRUCKER, H.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. Leukokinetic studies IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. J. clin. Invest., 40: 989-95, 1961.
- ATTSTROM, R. Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. J. period. Res., 5: 42-7, 1970.
- _____ & EGELBERG, J. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. J. period. Res., 5: 48-55, 1970.

- _____ & _____ Presence of leukocytes within the gingival crevices during developing gingivitis in dogs. J. period. Res., 6: 110-4, 1971.
- _____ & LARSSON, U. Effect of de complementation by carrageenan on the emigration of neutrophils and monocytes into dog gingival crevices. J. period. Res., 9: 165-75, 1974.
- _____; LAURELL, A.B.; LARSSON, U.; SJÖHOLM, A. Complement factors in gingival crevice material from healthy and inflamed gingiva in humans. J. period. Res., 10: 19-27, 1975.
- BAB, I.A.; SELA, M.N.; GINSBURG, I.; DISHON, T. Inflammatory lesions and bone resorption induced in the rat periodontium by Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans*. Inflammation, 3: 345-51, 1979.
- BABOOLAL, R. & POWELL, R.N. The effects of oral microbial endotoxins on phagocytosis of C-labelled starch granules by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Archs. oral Biol., 17: 249-54, 1972.
- BAKER, J.J.; CHAN, S.P.; SOCRANSKY, S.S.; OPPENHEIM, J.J. MERGENHAGEN, S.E. Importance of *Actinomyces* and certain Gram negative anaerobic organisms in the transformation of lymphocytes from patients with periodontal disease. Infect. Immun., 13: 1363-8, 1976.
- BATTISTO, J.R. & PAPPAS, F. Regulation of immunoglobulin synthesis by dextran. J. exp. Med., 138: 176-93, 1973.
- BEN-DAVID, A.; PAPPAS, F.; BATTISTO, J.R. Dextran induces changes in immunological responses to unrelated antigenic and haptenic stimuli. Immunology, 25: 567-72, 1973.

- BENECERRAF, B. & SEBESTYEN, M.M. Effect of bacterial endotoxins in the reticuloendothelial system. Fedn. Proc., 16: 860 - 7, 1957.
- BURTON, A.J. & CARTER, H.E. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. Biochemistry, 3: 411-8, 1964.
- BYERS, C.W.; TOTO, P.D.; GARGIULO, A.W. Levels of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the human inflamed gingiva. J. Periodont., 46: 387-90, 1975.
- CARROLL, B.J.; PEARSON, M.J.; MARTIN, F.I.R. Evaluation of three acute tests of hypothalamic-pituitary-adrenal function. Metabolism, 18: 476-83, 1969.
- CHERVENICK, P.A.; BOGGS, D.R.; MARSH, J.C.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. The blood and bone marrow neutrophil response to graded doses of endotoxin in mice. Proc. Soc. exp. Biol., 126: 891-5, 1967.
- CHRISTY, J.H. Pathophysiology of Gram negative shock. Am. Heart J., 81: 694-701, 1971.
- CHURCH, H. & DOLBY, A.E. The effect of age on the cellular immune response to dento-gingival plaque extract. J. period. Res., 13: 120-6, 1978.
- CIANCIOLA, L.J.; GENCO, R.J.; PATTERS, M.T.; MCKENNA, J.; OSS, C.J. Defective polymorphonuclear leucocyte function in a human periodontal disease. Nature, 265: 445-7, 1977.
- CLARK; R.A.; PAGE, R.C.; WILDE, G. Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. Infect. Immun., 18: 694-700, 1977.

- CLUFF, L.E. Effects of endotoxins on susceptibility to infections. J. infect. Dis., 122: 205-15, 1970.
- COURANT, P.R. & BADER, H. *Bacteroides melaninogenicus* and its products in the gingiva of man. Periodontics, 4: 131-6, 1966.
- _____ & GIBBONS, R.J. Biochemical and immunological heterogeneity of *Bacteroides melaninogenicus*. Archs. oral Biol., 12: 1605-13, 1967.
- COUTINHO, A. & MOLLER, G. B cell mitogenic properties of thymus independent antigens. Nature, 245: 12-4, 1973.
- CRAWFORD, J.M.; TAUBMAN, M.A.; SMITH, D.J. The effects of immunisation with periodontopathic microorganisms on periodontal bone loss in gnotobiotic rats. J. period. Res., 13: 445-59, 1978.
- CUNNINGHAM, A.J. & SZENBERG, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. Immunology, 14: 599-600, 1968.
- DAVIES, D.A.L.; CRUMPTON, M.J.; MACPHERSON, I.A.; NUTCHISON, A.M. The adsorption of bacterial Polysaccharides by Erythrocytes. Immunology, 2: 157-71, 1958
- DIAMANTSTEIN, T.; VOGT, W.; RUHL, H.; BOCHERT, G. Stimulation of DNA synthesis in mouse lymphoid cells by polyanions *in vitro*. I. Target cells and possible mode of action. Eur. J. Immun., 3: 488-93, 1973.
- DINARELLO, C.A.; GOLDIN, N.P.; WOLFF, S.M. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. J. exp. Med., 139: 1369-81, 1974.

- ELLIN, R.J. & WOLFF, S.M. Biology of endotoxin. Am. Rev. Med., 27: 127-41, 1976.
- ENGEL, D.; CLAGETT, T.; PAGE, R.; WILLIAMS, B. Mitogenic activity of *Actinomyces viscosus*, I. Effects on murine T and B lymphocytes and partial characterisation. J. Immun., 118: 1466-71, 1977.
- _____ ; VAN EPPS, D.; CLAGETT, T. *In vivo* and *in vitro* studies on possible pathogenic mechanisms of *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun., 14: 548-54, 1976.
- FINE, D.P. Activation of the classical and alternate complement pathways by endotoxin. J. Immun., 112: 763-69, 1974.
- FINE, O.H.; TABAK, L.; OSHRAM, H.; SALKIND, A.; SIEGEL, K. Studies in plaque pathogenicity. I. Plaque collection and limulus lysate screening of adherent and loosely adherent plaque. J. period. Res., 13: 17-23, 1978.
- FRANK, M.M.; MAY, J.E.; KANE, M.A. Contributions of the classical and alternate complement pathways to the biological effects of endotoxin. J. infect. Dis., 128: 176-81, 1973.
- FREEDMAN, H.L.; LISTGARTE, M.A.; TAICHMANN, N.S. Electron microscope features of chronically inflamed human gingiva. J. period. Res., 3: 313-27, 1968.
- FRUHMANN, C.J. Extravascular mobilization of neutrophils. Ann. N. Y. Acad. Sci., 13: 968-1002, 1964.
- GALLIN, J.I.; CLARK, R.A.; FRANK, M.M. Kinetic analysis of the generation of the chemotactic factor in human serum via activation of the classical and alternate complement pathways. Clin. Exp. Immun., 3: 334-46, 1975.

- _____ & ROSENTHAL, A.S. The regulatory role of divalent cations in human granulocyte chemotaxis. Evidence for an association between calcium exchanges and microtubule assembly. J. Cell. Biol., 62: 594-609, 1974.
- GAVIN, J.B. The ultrastructure of the crevicular epithelium of cat gingiva. Am. J. Anat., 123: 283-96, 1968.
- GERY, I.; KRUGER, J.; SPIESEL, S.Z. Stimulation of B-lymphocytes by endotoxin. J. Immun., 108: 1088-91, 1972.
- GIBBONS, R.J.; SOCRANSKY, S.S.; SAWYER, S.; KAPSIMALIS, B.; MACDONALD, J.B. The microbiota of the gingival crevice area of man. II. The predominant cultivable organisms. Archs. oral Biol., 8: 281-9, 1963.
- GREISMAN, S.E.; CAROZZA, F.A.Jr.; HILL, J.D. Mechanisms of endotoxin tolerance. I. Relationship between tolerance and reticuloendothelial system phagocytic activity in the rabbit. J. exp. Med., 117: 663-74, 1963.
- _____ & HORNICK, R.B. Endotoxin tolerance. In: BEERS, R.F. & BASSET, E.G. The role of immunological factors in infectious, allergic and autoimmune processes. New York. Ed. Raven Press, 1976, p.43-50.
- _____ & WOODWARD, C.L. Mechanism of endotoxin tolerance VII. The role of the liver. J. Immun., 105: 1468-78, 1970.
- GUGGENHEIM, B. & SCHROEDER, H.E. Reactions in the periodontium to continuous antigenic stimulation in sensitised gnotobiotic rats. Infect. Immun., 10: 565-77, 1974.
- HAUSMANN, E.; RAISZ, L.G.; MILLER, W.A. Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue culture. Science, 168: 862-4, 1970.

- HAWLEY, C.E. & FALKLER, W.P. The anti-complementary activity of lipopolysaccharide preparations and sonicates from a strain of *Fusobacterium*. J. period. Res., 13: 24-36, 1978.
- HELLDEN, L. & LINDHE, J. Enhanced emigration of crevicular leukocytes mediated by factors in dental plaque. Scand. J. Immun., 81: 123-9, 1973.
- HELLERQVIST, C.G. & LINDBERG, A.A. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. Carb. Res., 16: 39-48, 1971.
- _____ ; LINDBERG, B.; SVENSSON, S.; HOLME, T.; LINDBERG, A.A. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell wall lipopolisaccharide from *Salmonella typhimurium* LT2. Carb. Res., 9: 237-41, 1969.
- HERION, J.C.; WALKER, R.I.; HERRIG, W.B.; PALMER, J.G. Effects of endotoxin and nitrogen mustard on leukocyte kinetics. Blood, 25: 522-40, 1965.
- HINT, H.C. & RICHTER, A.W. Chronic toxicity of dextran sulphate in rabbits. Brit. J. Pharmac., 13: 109-12, 1958.
- HOFSTAD, T. Chemical characteristics of *Bacteroides melaninogenicus* endotoxin. Archs. oral Biol., 13: 1149-55, 1968.
- _____ Chemotypes of *Veillonella* lipopolysaccharides. Acta odont. scand., 86: 47-50, 1978.
- HORN, R.G. & COLLINS, R.D. Studies on the pathogenesis of the generalized Schwartzman reaction. The role of granulocytes. Lab. Invest., 18: 101-7, 1968.

- HORTON, J.E.; LEIKIN, S.; OPPENHEIM, J.J. Human lymphoproliferative reaction to saliva and dental plaque deposits: an *in vitro* correlation with periodontal disease. J. Periodont., 43: 522-7, 1972.
- HOTZ, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMID, R. Carbohydrates in pooled dental plaque. Caries Res., 6: 103-21, 1972.
- IRVING, J.T.; HEELEY, J.D.; AMDUR, B.H.; SOCRANSKY, S.S. Pathological changes caused by the injection of lipids isolated from Gram positive organisms into the gingiva of rats. J. period. Res., 14: 160-6, 1979.
- IVANYI, L. Immune responses to dextrans, levans and lipopolisaccharide in man. In: LEHNER, T. The borderland between caries and periodontal disease. London, Ed. Acad. Press, 1977, p. 199-210.
- _____ & LEHNER, T. Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. Archs. oral Biol., 15: 1089-96, 1970.
- _____ & _____ Interdependence of *in vitro* responsiveness of cord and maternal blood lymphocytes to antigens from oral bacteria. Clin. Exp. Immun., 30: 252-8, 1977a.
- _____ & _____ The effect of Levamisole on gingival inflammation in man. Scand. J. Immun., 6: 219-26, 1977b.
- _____ ; WILTON, J.M.A.; LEHNER, T. Cell-mediated immunity in periodontal disease: cytotoxicity, migration inhibition and lymphocyte transformation studies. Immunology, 22: 141-5, 1972.

- JENSEN, S.B.; JACKSON, F.U.; MERGENHAGEN, S.F. Alterations in type and bactericidal activity of mouse peritoneal phagocytes after intraperitoneal administration of endotoxin. Acta odont. scand., 22: 71-93, 1964.
- JOHNSON; I.H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. J. period. Res., 10: 332-45, 1975.
- JORDAN, H.V.; KEYES, P.H.; BELLACK, S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats injected with *Actinomyces* of human origin. J. period. Res., 7: 21-8, 1972.
- KAHNBERG, K.E. & ATTSTRÖM, R. The effect of decompensation with carrageenan on experimental gingivitis in hyperimmune dogs. J. period. Res., 12: 479-90, 1976.
- KELLER, H.V. & SORKIN, E. Studies on chemotaxis. V. On the chemotactic effect of bacteria. Int. Archs. Allergy, 31: 505-17, 1967.
- KELSTRUP, J.; HOLM, P.; POULSEN, S. Reduction of the formation of dental plaque and gingivitis in humans by crude mutanase. Scand. J. Immun., 86: 93-102, 1978.
- KIGER, R.D.; WRIGHT, W.H.; CREAMER, H.R. The significance of lymphocyte transformation responses to various microbial strains. J. Periodont., 45: 780-5, 1974.
- KNOX, K.W. & WICKEN, A.J. Immunological properties of teichoic acids. Bact. Rev., 37: 215-57, 1973.
- KRAAL, J.H. & BOWLES, R.D. Quantitation of gingival polymorphonuclear leukocyte exudation in dogs. J. period. Res., 16: 235-41, 1977.

- _____ & CHANCELLOR, M.B.; BRIDGES, R.B.; BEWIS, K.G.;
HAWKE, J.E. Variations in the gingival polymorphonuclear
leukocyte migration rate in dogs induced by chemotactic agents
in serum and migration inhibitor from tobacco smoke.
J. period. Res., 12: 242-9, 1977.
- KRISTOFFERSON, T. & HOFSTAD, T. Chemical composition of
lipopolysaccharide endotoxins from human oral *Fusobacteria*.
Archs. oral Biol., 15: 909-16, 1970.
- LAVINE, W.S.; MADERAZO, E.G.; STOLMAN, J.; WARD, P.A.; COGEN, R.B.;
GREENBLATT, I.; ROBERTSON, P.B. Impaired neutrophil chemotaxis
in patients with juvenile and rapidly progressing periodontitis.
J. period. Res., 14: 10-9, 1979.
- LEHNER, T. & CLARRY, E.D. Acute ulcerative gingivitis. An
immuno-fluorescent investigation. Br. dent. J., 12: 366-70,
1966.
- _____ ; WILTON, J.M.A.; CHALLACOMBE, J.J.; IVANYI, L.
Sequential cell-mediated immune responses in experimental
gingivitis in man. Clin. Exp. Immun., 16: 481-92, 1974.
- LOE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in
man. J. periodont., 36: 177-87, 1965.
- LOESCHE, W.J. & SYED, S.A. Bacteriology of human experimental
gingivitis: effects of plaque and gingivitis score.
Infect. Immun., 21: 830-9, 1978.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein
measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem.,
193: 265-75, 1951.

LUDERITZ, O.; GALANOS, C.; LEHMANN, V.; NURMINEN, M.; RIWTSCHHEL, E.T.; ROSENFELDER, G.; SIMON, M.; WESTPHAL, O. Lipid A. J. infect. Dis., 128: 17-29, 1973.

MACDONALD, J.B.; SOCRANSKY, S.S.; GIBBONS, R.J. Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. J. Dent. Res., 42: 529-44, 1963.

MANCINI, G.; CARBONARA, M.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single immunochemistry. Immunochemistry, 2: 235-54, 1965.

MCARTHUR, W.P. & TAICHMAN, N.S. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. II. Modulation of rabbit polymorphonuclear leukocyte hydrolase release by polysaccharides in response to *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Infect. Immun., 14: 1309-14, 1976.

MCDUGALL, W.A. Plaque studies. IV. Levans in plaque. Aust. dent. J., 9: 1-15, 1964.

_____ Penetration pathways of a topically applied foreign protein into rat gingiva. J. period. Res., 6: 89-99, 1971.

MERGENHAGEN, S.E. & JENSEN, S.B. Specific induced resistance of mice to endotoxin. Proc. Soc. exp. Biol., 110: 139-42, 1962.

_____ ; ROSENSTREICH, D.L.; WILTON, J.M.A.; WAHL, S.M.; WAHL, L.K. Interaction of endotoxin with lymphocytes and macrophages. In: BEERS, R.F. & BASSET, E.G. The role of immunological factors in infections, allergic and autoimmune process. New York, Ed. Raven Press, 1976, p. 17-27.

_____ ; SNYDERMAN, R.; GEWURZ, H.; SHIN, H.S. Significance of complement to the mechanism of action of endotoxin. Curr. Top. Microbio. Immun., 50, 37-77, 1969.

- _____ & VARAH, E. Serologically specific lipopolysaccharides from oral *Veillonella*. Archs. oral Biol., 8: 31-6, 1963.
- MILNER, K.C. & RUDBACH, J.A. Relationship between presence of specific antibody and tolerance to endotoxin. Bact. Proc., p. 96, 1968.
- MOELLER, G.R.; TERRY, L.; SNYDERMAN, R. The inflammatory response and resistance to endotoxin in mice. J. Immun., 120: 116-23, 1978.
- MORENO, C.; COURTENAY, B.M.; HOWARD, J.G. Molecular size and structure in relation to the tolerogenicity of small fructosans (levans). Immunochemistry, 13: 429-35, 1976.
- NELSON, D.S. & BOYDEN, S.V. The loss of macrophage from peritoneal exudates following the injection of antigens into guinea-pigs with delayed-type hypersensitivity. Immunology, 6: 264-75, 1963.
- NETER, E. Endotoxins and the immune response. Curr. Top. Microbiol. Immun., 47: 82-124, 1969.
- NEUMAN, S.M.; KENNEY, E.B.; TRAUERIG, H. The effect of topical application of dextran on the gingiva of the beagle dog. J. Periodont., 47: 171-9, 1976.
- NISENGARD, R.J.; BEUTNER, E.H.; HAZEN, S.P. Immunologic studies of periodontal diseases. IV. Bacterial hypersensitivity and periodontal disease. J. Periodont., 39: 329-32, 1968.
- O'GRADY, R.L.; HARROP, P.J.; KNOX, K.W.; WICKEN, A.J. Studies on the binding of lipoteichoic acid to osseous tissue. J. period. Res., 15: 206-15, 1980.
- OKADA, H. & SILVERMAN, M.S. Chemotactic activity in periodontal disease. I. The role of complement in monocyte chemotaxis. J. period. Res., 14: 20-5, 1979a.

- _____ & _____ Chemotactic activity in periodontal disease. II. The generation of complement-derived chemotactic factors. J. period. Res., 14: 147-52, 1979b.
- PAGE, R.C.; DAVIES, P.; ALLISON, A.C. Effects of dental plaque on the production and release of lysosomal hydrolases by macrophages in culture. Archs. oral Biol., 18: 1481-95, 1973.
- _____ & SCHROEDER, H.E. The pathogenesis of inflammatory periodontal disease. Lab. Invest., 33: 235-48, 1976.
- PEAVY, D.L.; SHANDS, J.W.Jr.; ADLER, W.A.; SMITH, R.T. Mitogenicity of bacterial endotoxins: characterization of the mitogenic principle. J. Immun., 111: 352-7, 1973.
- RANNEY, R.R. Immunofluorescent localisation of soluble dental plaque components in human gingiva affected by periodontitis. J. period. Res., 13: 99-108, 1978.
- _____ & MONTGOMERY, E.H. Vascular leakage resulting from topical application of endotoxin in the gingiva of the beagle dog. Archs. oral. Biol., 18: 963-70, 1973.
- RITZ; H.L. Fluorescent antibody staining of *Neisseria*, *Streptococcus* and *Veillonella* in frozen sections of human dental plaque. Archs. oral Biol., 14: 1073-84, 1969.
- RIZZO, A.A. & MERGENHAGEM, S.E. Histopathology and effects of endotoxin injection into rabbit oral mucosa. Archs. oral Biol., 9: 659-70, 1964.
- ROSENFELD, S.I.; BAUM, J.; STEIGBIGEL, R.T.; LEDDY, J.P. Hereditary deficiency of the fifth component of complement in man. II. Biological properties of C5-deficient human serum. J. clin. Invest., 57: 1635-43, 1976.

- ROSSEN, R.D.; WOLFF, S.M.; BUTLER, W.T. The antibody response in nasal washings and serum to *S. typhosa* endotoxin administered intravenously. J. Immun., 99: 246-54, 1967.
- RUDBACH, J.A. Molecular immunogenicity of bacterial lipopolysaccharide antigens: Establishing a quantitative system. J. Immun., 106: 993-1001, 1971.
- SCHMID, L. & BRUNE, K. Assessment of phagocytic and antimicrobial activity of human granulocytes. Infect. Immun., 10: 1120-6, 1974.
- SCHORLEMMER, H.U. & ALLISON, A.C. Effects of activated complement components on enzyme secretion by macrophages. Immunology, 31: 781-8, 1976.
- _____ ; BURGER, R.; HYLTON, W.; ALLISON, A.C. Induction of lysosomal enzyme release from cultured macrophages by dextran sulphate. Clin. Immun. Immunopath., 7: 88-96, 1977.
- SCHROEDER, H.E. Histopathology of the gingival crevice. In: LEHNER, T. The borderland between caries and periodontal disease. London. Ed. Acad. Press, 1977, p. 43-103.
- SCHWARTZ, J.; STINSON, F.L.; PARKER, R.B. The passage of tritiated bacterial endotoxin across gingival crevicular epithelium. J. Periodont., 43: 270-6, 1972.
- SHAPIRO, L.; LODATO, F.M.; COURANT, P.R.; STALLARD, R.E. Endotoxin determinations in gingival inflammation. J. Periodont., 42: 591-6, 1971.
- SHIN, H.S.; GEWURZ, H.; SNYDERMAN, R. Reaction of a cobra venom factor with guinea pig complement and generation of an activity chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. Proc. Soc. exp. Biol., 131: 203-7, 1969.

- SIMON, B.; GOLDMAN, H.; RUBEN.; BAKER, E. The role of endotoxin in periodontal disease. II. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the clinical degree of inflammation. J. Periodont., 41: 81-6, 1970.
- SKAPSKI, H. & LEHNER, T. A crevicular washing for investigating immune components of crevicular fluid in man. J. period. Res., 11: 19-24, 1976.
- SLOTS, J. & HAUSMANN, F. Longitudinal study of experimentally induced periodontal disease in *Macaca arctoides*: Relationship between microflora and alveolar bone loss. Infect. Immun., 23: 260-7, 1979.
- SMITH, N.P. & LANG, N.P. Lymphocyte blastogenesis to plaque antigens in human periodontal disease. II. The relationship to clinical parameters. J. period. Res., 12: 310-7, 1977.
- SNYDERMAN, R. A role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. J. period. Res., 49: 356-61, 1972.
- _____ Immunological mechanisms of periodontal tissue destruction. J. Am. dent. Ass., 87: 1020-6, 1973.
- _____ ; GEWURZ, H.; MERGENHAGEN, S.E. Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide: generation of a factor chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. J. exp. Med., 128: 259-75, 1968.
- _____ ; PHILLIPS, J.K.; MERGENHAGEN, S.E. Biological activity of complement *in vivo*. Role of C5 in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates. J. exp. Med., 134: 1131-43, 1971.

- _____ ; PIKE, M.C.; MCCARLEY, D.; LANG, L. Quantitation of mouse macrophage chemotaxis *in vitro*: Role of C5 for the production of chemotactic activity. Infect. Immun., 11: 488-92, 1975.
- SOCRANSKY, S.S. Microbiology of periodontal disease-present status and future consideration. J. Periodont., 48: 497-504, 1977.
- SUSSMAN, H.I.; BARTELS, H.A.; STAHL, S.S. The potential of microorganisms to invade the lamina propria of human gingival tissue. J. Periodont., 40: 210-221, 1969.
- SVEEN, K. The capacity of lipopolysaccharides from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella* to produce skin inflammation and the local and generalised Schwartzman reaction in rabbits. J. period. Res., 12: 340-50, 1977.
- TAICHMAN, N.S.; FREEDMAN, K.L.; URIUHARA, T. Inflammation and tissue injury. I. The response to intradermal injections of human dento-gingival plaque in normal and leucopenic rabbits. Archs. oral Biol., 11: 1385-92, 1966.
- _____ ; HAMMOND, B.F.; TSAI, C.; BAEHNI, P.C.; MCARTHUR, W.P. Interaction of Inflammatory cells and oral microorganisms VIII. *In vitro* polymorphonuclear responses to viable bacteria and to subcellular components of avirulent and virulent strains of *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun., 21: 594-604, 1978.
- _____ & MCARTHUR, W.P. Interaction of inflammatory cells and oral bacteria: release of lysosomal hydrolases from rabbit polymorphonuclear leukocytes exposed to Gram-positive plaque bacteria. Archs. Oral Biol., 21: 257-263, 1976.

- TAKEUCHI, H. SUMITAMI, M.; TSUBAKIMOTO, F.; TSUTSUI, M. Oral microorganisms in the gingiva of individuals with periodontal disease. J. Dent. Res., 53: 132-6, 1974.
- TEMPEL, T.A.; KIMBALL, H.R.; KAKCHASHI, S.; AMEN, C.R. Host factors in periodontal disease: periodontal manifestations of Chediak-Higashi syndrome. J. period. Res., 7: 26-7, 1972.
- TOLO, K. A study of the permeability of gingival pocket epithelium to albumin in guinea pigs and Norwegian pigs. Archs. oral Biol., 16: 881-8, 1971.
- _____ Penetration of human albumin through the oral mucosa of guinea-pigs immunised to this protein. Archs. oral Biol., 19: 259-63, 1974.
- _____ ; BRANDTZAEG, P.; JONSEN, J. Mucosal penetration of antigen in the presence or absence of serum derived antibody. An *in vitro* study of rabbit oral and intestinal mucosa. Immunology, 33: 783-93, 1977
- TREJO, R.A. & DI LUZIO, N.R. Influence of reticuloendothelial system (RES) functional modification on endotoxin detoxication by liver and spleen. J. Retic. Soc., 10: 512-25, 1971.
- VAN HOUTE, J.; GIBBONS, R.J.; BANGHART, S. Adherence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on the tooth surface. Archs. oral Biol., 15: 1025-34, 1970.
- VAN PALENSTEIN-HELDERMAN, W.H. Total viable count and differential count of *Vibrio sputorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas sputigena*, *Bacteroides ochraceus* and *Veillonella* in the inflammed and non inflamed gingival crevice. J. period. Res., 10: 294-305, 1976.

- WALKER, D.M. Lymphocytes and macrophages in the gengiva. In: LEHNER, T. The borderland between caries and periodontal disease. London, Ed. Acad. Press, 1977, p. 185-98.
- WATSON, J. & RIBLET, R. Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. J. exp. Med., 140: 1147-61, 1974.
- WESTPHAL, D. Bacterial endotoxins. Int. Archs. Allergy appl. Immun., 49: 1-43, 1975.
- _____ & JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides. Extration with phenol-water and further applications of the procedure. In: WHIS, R.L. Methods in carbohydrate chemistry. New York and London, Ed. Acad. Press, 1965, Vol. V, p: 83-91.
- WICKEN, A.J. & KNOX, K.W. Studies on the group F antigen of *lacto bacilli*: isolation of a teichoic acid-lipid complex from *Lactobacillus fermenti*. J. gen. Microbiol., 60: 293-301, 1970.
- _____ & _____ Lipoteichoic acid: A new class of Bacterial antigen. Science, 187: 1161-7, 1975.
- WIENER, R.; BECK, A.; SHILO, M. Effect of bacterial lipopolysaccharides on mouse peritoneal leukocytes. Lab. Invest., 14: 475-87, 1965.
- WILLIAMS, B.L.; PANTALONE, R.M.; SHERRIS, J.C. Subgingival microflora and periodontitis. J. period. Res., 11: 1-18, 1976.
- WILTON, J.M.A. The function of complement in crevicular fluid. In: LEHNER, T. The borderland between caries and periodontal disease. London, Ed. Acad. Press, 1977, p. 223-47.

- _____ ; IVANYI, L.; LEHNER, T. Cell mediated immunity and humoral antibodies in acute ulcerative gingivites. J. period. Res., 6: 9-16, 1971.
- _____ ; RENGGLI, H.H.; LEHNER, T. A functional comparison of blood and gingival inflammatory polymorphonuclear leucocytes in man. Clin. Exp. Immun., 27: 152-8, 1977a.
- _____ ; _____ ; _____ The role of Fc and C3 receptors in phagocytosis by inflammatory polymorphonuclear leucocytes in man. Immunology, 32: 955-61, 1977b.
- _____ ; ROSENSTREICH, D.L.; OPPENHEIM, J.J. Activation of guinea pig macrophages by bacterial lipopolysaccharides requires bone marrow derived lymphocytes. J. Immun., 114: 388-93, 1975.
- WOOD, J.M. The amount, distribution and metabolism of soluble polysaccharides in human dental plaque. Archs. oral Biol., 12: 849-58, 1967.
- _____ The state of Hexose sugar in human dental plaque and its metabolism by the plaque bacteria. Archs. oral Biol., 14: 161-8, 1969.
- WRIGHT, D.G. & GALLIN, J.I. Modulation of the inflammatory response by products released from human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. Generation and inactivation of the chemotactic factor C5a. Inflammation, 1: 23-39, 1975.
- WRIGHT, L.J.; KIMBALE, H.R.; WOLFF, S.M. Alterations in host responses to experimental *Candida albicans* infections by bacterial endotoxin. J. Immun., 103: 1276-82, 1969.