

JOSÉ MARIA BERTÃO

PRESENÇA DE EOSINÓFILOS NA DOENÇA
PERIODONTAL DE RATOS

Orientador: Prof. Dr. Oslei Paes
de Almeida

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, -
da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do grau
de MESTRE EM BIOLOGIA E PATOLO
GIA BUCO-DENTAL.

*Este exemplar foi devidamente corrigido de acordo
com a resolução CCP6/020/83*

Piracicaba, 18 de julho de 1985

Almeida

PIRACICABA-SP
-1985-

Ao Diretor Geral e Secretária Geral da
Associação Prudentina de Educação e
Cultura-(APEC). Dr.AGRIPINO DE OLIVEI-
RA LIMA FILHO e Sra.ANA CARDOSO MAIA -
DE OLIVEIRA LIMA, pela bolsa concedida
para realização deste curso, bem como
de outros benefícios que eles tão gen-
tilmente tem nos oferecido.

Ao Professor Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA;
pela orientação segura deste trabalho e
também pela amizade e carinho que de
monstrou durante todo o curso, procurando
mostrar os difíceis caminhos da Pes-
quisa Científica.

Este trabalho
foi realizado
com o auxílio
do C. N. Pq.

Processo nº:

40.4947/1.982

Aos meus pais,

PRIMO e ROSA,

Aos meus irmãos,

A minha esposa,

ELIZABETH,

e meus filhos,

RICARDO E ROSANE,

dedico este trabalho.

Aos Diretores das Faculdades Integradas da APEC, Faculdade de Odontologia, Farmácia e Bioquímica, Enfermagem, e Fisioterapia; Dr. Mário Leite Braga, Dr. João Carlos Grígoli, Dra. Dirce Trevisse Novaes e Carlo Ceriani, pela colaboração em proporcionar condições no meu horário de trabalho, para que houvesse oportunidade, para realizar esse curso.

Aos Professores do Departamento de Biologia e Patologia Bucodental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, que ministraram aulas e transmitiram seus conhecimentos e experiências, durante o decorrer do curso.

Ao Professor Dr. Almir Lima de Castro, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelo estímulo, orientações e amizade existente entre nós.

Ao Sr. Antonio Kerches de Campos, funcionário do laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela colaboração na parte experimental deste trabalho.

Aos Professores e Funcionários da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente, pela colaboração e amizade a nós dedicada.

Ao Dr. Luis Sasso Stuani, Dra. Arlete Gomes dos Santos e Srta. Lidia Ferro do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente que sempre nos estimularam e colaboraram para que pudéssemos realizar esse curso.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho.

I N D I C E

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	04
2.1. Microscopia Óptica.....	04
2.2. Contagem de Eosinófilos.....	04
2.3. Microscopia Eletrônica.....	05
2.4. Exames Hematológicos.....	05
3. RESULTADOS.....	07
3.1. Aspectos Macroscópicos.....	07
3.2. Aspectos Microscópicos.....	07
3.3. Gengiva do Grupo Controle.....	07
3.4. Gengiva dos Grupos Experimentais.....	08
3.5. Presença de Eosinófilos e Mastócitos na gengiva de Rato.....	10
3.6. Exames Hematológicos.....	11
4. DISCUSSÃO.....	13
5. FIGURAS.....	17
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	34
7. SUMMARY.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

I N T R O D U Ç Ã O

I N T R O D U C Ã O

Os eosinófilos foram descritos por ERLICH, em 1879, como um leucócito com afinidade especial pela eosina. A literatura sobre o eosinófilo é extensa, e basta lembrar que SCHWARZ, em 1914, fez uma revisão contendo cerca de 2.700 referências. A importância biológica dos eosinófilos é assunto de discussões e especulações atuais. Trabalhos recentes mostram que participam em reações de hipersensibilidade imediatas e infecções provocadas por helmintos, como *Schistosoma mansoni* e *Trichinella spiralis* (BUTTERWORTH et alii, 1975; MAHMOUD et alii, 1975). Nas reações de hipersensibilidade imediata, o eosinófilo atuaria como modulador da resposta imunológica e teria ação conjunta com os mastócitos e imunoglobulinas do tipo IgE (AUSTEN, 1978). Os grânulos dos eosinófilos contêm histaminase, arilsulfatase e fosfolipase, que podem neutralizar substâncias ativas liberadas dos mastócitos, como histamina e metabólitos do ácido aracídico (GOETZL; 1976, WELLER e GOETZL, 1979). Nas inflamações provocadas por helmintos, observações "in vivo" e "in vitro" demonstraram que os eosinófilos, através de enzimas dos grânulos citoplasmáticos, são citotóxicos para os parasitas e mais efetivo que neutrófilos e macrófagos nesta função (BASS e SZEJDA, 1979).

Os eosinófilos são células sanguíneas que se acumulam em grande número em tecidos como nasofaringe, pulmões, pele intestino e trato genito-urinário (FOOT, 1965; HUDSON, 1968; SPRY, 1971). O destino dos eosinófilos teciduais é pouco conhecido, mas alguns são eliminados pela luz dos brônquios ou intestinos, e outros são fagocitados por macrófagos (TEIR et alii, 1963; ROSS, e KLEBANOFF, 1966). Pouco se sabe sobre a função dos eosinófilos nestes tecidos, mas há evidências de que participam como moduladores de reações de hipersensibilidade imediata (AUSTEN, 1978; GOETZL et alii, 1979).

Em outras patologias, onde os eosinófilos estão presentes, a função desta célula ainda está no campo da especulação (BEESON e BASS, 1977).

Um dos obstáculos no estudo dos eosinófilos tem sido a dificuldade em demonstrar atividades biológicas para essa célula, distinta de outros leucócitos. Por exemplo: eosinófilos e neutrófilos, respondem quimiotaticamente a uma variedade de agentes, fagocitam, sofrem desgranulação e matam microorganismos (KAY A.B, 1974; CLARK et alii, 1975). Certos agentes como o fator quimiotático para eosinófilo da anafilaxia (ECF-A), preferencialmente, atraem o eosinófilo, mas não há marcada diferença entre neutrófilos e eosinófilos, em termos do tipo de partículas que essas células fagocitam, seu tipos de engolfamento, o modo de desgranulação ou tipo de destruição de microorganismos. Se, de certa forma, o eosinófilo é, mais lento que o neutrófilo na ingestão (CLINE et alii, 1968), e na morte da bactéria, paradoxalmente tem aumento da atividade metabólica no que se refere à produção de H₂O₂, resposta oxidativa e iodinação (BAHMER & JOHNSTON, 1971; MICKBERG et alii, 1972; KAY A.B., 1976).

No entanto, estudos efetuados por SARAN (1975), demonstraram que a atividade fagocítica do eosinófilo de *S.aureus* é aumentada, quando esses microorganismos estão associados a anticorpos. Esta observação reforça a hipótese de que os eosinófilos são mais eficientes em fagocitar complexos imunes.

Embora as funções dos eosinófilos em doenças parasitárias e de hipersensibilidade do tipo imediata começam a se tornar claras, pouco se sabe das funções em outras doenças, como as neoplasias, doenças do colágeno e nas hipereosinofílias. Possivelmente, nessas condições, outras características bioquímicas da célula, são operativas, as quais não estão necessariamente relacionadas com mecanismos associados aos estados parasíticos ou alérgicos.

O eosinófilo não pode ser mais considerado como inocente espectador nas respostas inflamatórias, mas sim como um participante ativo e, provavelmente, muito efetivo (KAY, A.B., 1976).

A gengiva e os tecidos, onde os eosinófilos são usualmente observados (intestinos, mucosa nasal, brônquios) tem a característica comum de estarem direta ou indiretamente expostas ao meio ambiente. Entretanto, na gengiva clinicamente normale

na doença periodontal, eosinófilos ainda não foram descritos no conjuntivo extravascular (APPELGREN et alii,1977).

A doença periodontal inflamatória apresenta complexos mecanismos patogênicos na sua evolução, embora não haja dúvidas quanto ao papel da placa bacteriana na etiologia da inflamação periodontal.

As reações imunológicas aos antígenos bacterianos da placa, se processam após a inflamação aguda inicial provocada pelas toxinas e enzimas da placa dental. É possível que a contínua estimulação antigênica da placa acabe gerando mecanismos imunopatológicos que, ao longo do tempo, se convertam nos elementos efetadores da destruição tecidual, na doença periodontal inflamatória. Compreende-se, portanto, que a patogênese e a evolução da doença periodontal inflamatória, seja mais do que uma simples consequência da agressão direta dos agentes flozógenos da placa, sobre os tecidos periodontais, dependem também dos fenômenos destrutivos relacionados aos mecanismos locais de defesa, representados pela própria reação inflamatória e pelos processos imunopatológicos ou de hipersensibilidade (CATANZARO,1982).

A doença periodontal inflamatória humana apresenta componentes humorais e celulares que sugerem a participação de mecanismos de hipersensibilidade imediata e tardia, (IVANI et alii,1972; PAGE e SCHROEDER,1976). Neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos estão sempre presentes na área inflamada, entretanto, ainda não foi demonstrada a presença de eosinófilos na inflamação gengival e periodontal de humanos (APPELGREN et alii,1977).

Estudando a doença periodontal em ratos, observamos que eosinófilos fazem parte do infiltrado inflamatório e, neste trabalho, descrevemos a participação e os aspectos ultra-estruturais dos eosinófilos no tecido gengival de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

MICROSCOPIA ÓPTICA

Foram usados 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, pesando de 150 a 200 gramas, alimentados, com ração Ceres (Ração Ceres S.A. - Piracicaba-SP) e água "Ad libitum". A doença Periodontal foi provocada de acordo com JOHNSON (1975). Os animais foram anestesiados com éter etílico para aplicação de uma ligadura, fio de algodão nº 24, marca Corrente, na região cervical dos primeiros molares inferiores, esquerdo, para atuar como irritante e favorecer o acúmulo de placa. Os primeiros molares inferiores direito, sem ligaduras, foram usados como controle. Grupo de 4 animais foram mortos por inalação de éter etílico aos 8, 20, 30, 45, 70 e 90 dias, após a colocação do irritante gengival (ligadura). Imediatamente após a morte dos animais, as mandíbulas foram retiradas e fixadas em formol, a 10%, por 48 horas, e os aspectos macroscópicos observados com lupa estereoscópica Zeiss. As ligaduras de algodão foram, então, cuidadosamente removidas e as peças descalcificadas em ácido tricloro-acético a 6%, durante 5 a 7 dias. A região dos dentes molares foi seccionada, seguindo plano sagital mesio-distal e, após inclusão em parafina, foram feitos cortes de 7µm de espessura. Secções alternadas foram coradas com hematoxilina e eosina para observação dos eosinófilos e com azul de Toluidina, a 1%, pH 4,0 por 30 minutos para o estudo de mastócitos.

CONTAGEM DOS EOSINÓFILOS

A contagem dos eosinófilos foi feita na gengiva da face mesial do primeiro molar inferior e na papila interdental, entre os 1ºs e 2ºs molares inferiores, usando-se três cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, de cada animal. Das médias obtidas, desta contagem, foi obtida a média e o desvio padrão de cada grupo experimental. Todos os eosinófilos presentes, no tecido gengival foram computados, exceto os que estavam no interior dos vasos sanguíneos. A contagem dos eosinófilos foi feita num fotomicroscópio Zeiss, usando-se objetiva de imersão.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para os estudos de microscopia eletrônica, foram usa dos quatro ratos semelhantes aos descritos anteriormente e trata dos experimentalmente da mesma forma. Após noventa dias, os quatro animais foram anestesiados com éter etílico e, após lavagem do sistema circulatório com solução fisiológica tamponada, foi feita a perfusão com 150 ml de glutaraldeído a 2,5%, pH 7,4, colocando-se, simultaneamente, algodão embebido no mesmo fixador, na região dos primeiros molares inferiores. Após a perfusão, a mandíbula foi imersa em glutaraldeído a 4°C e, a gengiva da face vestibular do 19 molar inferior, dissecada e cortada em pequenos fragmentos, com auxílio da lâmina de barbear. Após a fixação em glutaraldeído, o material foi pós fixado em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas. A desidratação foi feita em álcool etílico e ôxi do de propileno e a inclusão em araldite. Os cortes de lum foram corados com azul de toluidina a 1% e os ultrafinos com acetato de uramila e citrato de chumbo. As observações e documentações - fotográficas foram feitas no microscópio eletrônico Phillips da disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da USP.

EXAMES HEMATOLÓGICOS

Dez ratos da mesma espécie foram usados para os estu dos hematológicos. Durante sete dias, no mesmo horário foi feito a coleta de sangue através da cauda do animal, retirando-se, apro ximadamente 1 ml de sangue em recipientes contendo anticoagulante WINTROBE desidratado. Em seguida, foi feita a contagem global e diferencial dos glóbulos brancos.

A contagem total dos glóbulos brancos foi feita atra vés da técnica convencional, usando-se o líquido de TURK para di lução dos leucócitos e destruição dos eritrócitos, em pipeta di luidora de Thoma e a câmara de Neubauer para a contagem global dos leucócitos.

A contagem diferencial foi feita fazendo-se esfregaço, por extensão de sangue em lâminas de vidro, coradas pelo método de MAYER GRUNWALD-GIEMSA. A contagem dos leucócitos foi feita

contando-se 100 células no esfregaço com um aumento de 1000X com óleo de imersão. (MELO, 1970).

Do mesmo grupo de animais, foram selecionados 5 ratos onde foi feita a aplicação da ligadura com fio de algodão nos primeiros molares inferiores esquerdo durante 70 dias. Pela mesma técnica descrita anteriormente, foi efetuada a contagem total e diferencial dos glóbulos brancos.

R E S U L T A D O S

R E S U L T A D O S

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Grupo Controle: Nas amostras deste grupo, não foram observadas modificações de contorno, volume ou posição da gengiva.

Grupos Experimentais: Após a colocação da ligadura, as características macroscópicas da gengiva modificaram-se gradativamente, sem entretanto, apresentar aspecto patognomônico nos períodos experimentais usados neste trabalho. Em todos os períodos, a ligadura favoreceu o acúmulo de grande quantidade de restos alimentares e a formação de placa dental. A alteração macroscópica mais evidente foi o aumento de volume da gengiva, da face vestibular dos primeiros molares inferiores, que adquiriu características hiperplásicas, recobrando grande parte do fio de algodão da ligadura, facilmente observáveis a partir do período experimental de 45 dias (fig.1). Na face lingual, o aumento de volume gengival não foi pronunciado, situando-se a margem gengival a baixo da sua posição normal. Nos grupos de períodos experimentais maiores, (70 e 90 dias), as porções cervicais das raízes estavam expostas e, houve envolvimento de furcas e exposição das raízes até o terço médio. A papila interdental entre os 1º e 2º molares apresentou superfície achatada ou côncava, devido à ligadura, perdendo sua forma piramidal característica.

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

As principais características microscópicas da gengiva do grupo controle, e as alterações ocorridas nos grupos experimentais tratados com ligadura de fio de algodão, serão abordadas separadamente e, em seguida, será descrita a participação dos eosinófilos.

GENGIVA DO GRUPO CONTROLE

A gengiva da face mesial do 1º MID estava formada de epitélio escamoso estratificado queratinizado, com exceção

da porção que participava da junção dento-gengival. Entre as células do epitélio juncional, havia grande número de neutrófilos, e o cõrion gengival subjacente apresentava infiltrado inflamatório, com neutrófilos como os leucócitos predominantes. O epitélio da papila interdental entre os 1º e 2º molares inferiores não estava queratinizado e continha neutrófilos no seu interior. Projeções epiteliais, para o conjuntivo, delimitavam áreas que continham estruturas vasculares e células inflamatórias, especialmente neutrófilos.

GENGIVA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ligadura - 8 dias

A gengiva da face mesial do 1º MI apresentava ulcerações, com desorganização da camada epitelial e induto necrótico. Subjacente à zona necrótica, o tecido gengival estava inflamado, contendo neutrófilos, fibroblastos e vasos dilatados. Dois dos quatro casos deste grupo, apresentavam exposição óssea com evidentes sinais de necrose. No restante do tecido ósseo, a face voltada para as fibras periodontais mostravam extensas áreas de reabsorção, enquanto a face externa da tábua óssea estava recoberta pelo periosteio em franca atividade de neoformação óssea. O terço cervical do cemento da raiz mesial estava exposto em todos os casos. A papila interdental apresentava-se ulcerado, com epitélio recobrando parcialmente o conjuntivo inflamado. A região radicular cervical estava exposta e a inflamação gengival, de extensão variável, era intensa com os neutrófilos como células predominantes (Fig.02). O septo ósseo apresentava acentuada reabsorção.

Ligadura - 20 dias

O tecido epitelial da face mesial do 1º MI estava melhor organizado, com pequenas ulcerações persistindo nas regiões mais próximas ao cemento. O conjuntivo subjacente estava inflamado e, além de neutrófilos havia grande número de fibroblastos. O tecido ósseo apresentava áreas de reabsorção e de neoformação. A papila interdental adquiriu forma côncava ou achatada, devido do contato com o fio de algodão e o epitélio,

com 4 a 6 camadas de células, emitia pequenas projeções para o conjuntivo. O terço cervical da raiz estava exposto e sobre o epitélio, restos celulares e ósseos podiam ser observados. No conjuntivo, a inflamação era intensa e rica em neutrófilos. Entre a área com infiltrado inflamatório e a crista óssea, havia intensa proliferação de fibroblastos.

Ligadura - 30 dias

Na face mesial do 1º MI, o epitélio juncional e o epitélio de contato com o irritante estavam mais espessos, sem áreas de ulcerações e o infiltrado inflamatório era menos pronunciado. O tecido ósseo neoformado apresentava características de maturação, sem evidências de significantes reabsorções. O epitélio da papila interdental, de modo semelhante ao que ocorreu, na face mesial, estava espessado e com projeções para o conjuntivo. A intensidade da inflamação era menor do que a observada aos oito e vinte dias, com as células do infiltrado inflamatório localizadas no conjuntivo, entre as interdigitações delimitadas pelas projeções epiteliais.

Ligadura - 45 dias

O epitélio gengival da face mesial do 1º molar estava organizado e aderido ao cimento ao nível do terço médio da raiz e, no conjuntivo, os neutrófilos localizavam-se abaixo do epitélio juncional. O epitélio em contato com o fio de algodão, apesar de relativamente espesso, não estava queratinizado. O osso neoformado tinha características semelhantes ao restante do osso alveolar, notando-se, facilmente, a faixa de transição entre os ossos prè-existentes e neoformado. O epitélio da papila interdental apresentava projeções para o conjuntivo inflamado.

Ligadura - 70 e 90 dias

As características do epitélio e do conjuntivo na gengiva da face mesial do 1º molar, aos setenta e noventa dias, após aplicação da ligadura, foram semelhantes às descritas aos 45 dias. A papila continuava apresentando epitélio não queratinizado e a reação inflamatória era menos intensa do que nos períodos de oito e vinte dias (fig.03).

PRESENÇA DE EOSINÓFILOS E MASTÓCITOS NA GENGIVA DE RATO

Na gengiva do grupo controle, a média de eosinófilos foi de 1,33 na região mesial do 1º molar e de 2,15 na papila interdental. Oito dias após a colocação da ligadura, a inflamação, era intensa e o número de eosinófilos estava acima do observado no grupo controle, embora em proporção reduzida em relação aos neutrófilos. Na papila interdental, os eosinófilos foram observados mais frequentemente do que na mesial (7,74 e 2,99 respectivamente). Aos vinte dias, houve aumento no número de eosinófilos na gengiva mesial do 1º molar (10,16) e na papila interdental (17,00). Enquanto que aos oito dias, os eosinófilos estavam presentes, principalmente, nas áreas de maior infiltrado inflamatório, depois de vinte dias também foram observados nas áreas subjacentes, onde predominava a proliferação fibroblástica. Aos trinta dias, o infiltrado inflamatório gengival diminuiu em relação, aos tempos anteriores, mas ainda houve aumento de eosinófilos na região mesial do 1º molar e na papila interdental (16,58 e 25,40 respectivamente). Neste período, os eosinófilos estavam principalmente no conjuntivo, abaixo da zona de inflamação, próximos aos feixes de fibras colágenas. Aos quarenta e cinco dias, continuou o aumento de eosinófilos na gengiva da face mesial do 1º molar (27,24) e não houve modificação na papila interdental (24,32). Os neutrófilos estavam no conjuntivo sub-epitelial e os eosinófilos eram os únicos leucócitos nas áreas mais subjacentes. Ocasionalmente, eosinófilos foram observados no interior do tecido epitelial. Aos 70 e 90 dias, o número e localização dos eosinófilos foram semelhantes ao que ocorreu aos 45 dias. A tabela 1 e o gráfico 1 mostram a contagem de eosinófilos, nos diferentes períodos usados neste trabalho, e as figuras 2, 3, 4 e 5 ilustram eosinófilos entre os feixes de colágeno. Houve aumento gradativo do número de eosinófilos até o trigésimo dia e, posteriormente, não houve significativa modificação quantitativa. Pode-se observar que o desvio padrão é bastante alto, refletindo a variabilidade em animais do mesmo grupo. Esta variação é exemplificada com os quatro animais do grupo de 90 dias, que tiveram na papila interdental médias de 23,33; 12,00; 57,00 e 17,00 eosinófilos.

Mastócitos estavam em grande número nas áreas de mucosa oral próximas aos dentes molares. Entretanto, no tecido gengival, particularmente, nas áreas inflamadas os mastócitos - raramente foram observados nas gengivas dos animais do grupo controle e dos vários grupos experimentais. Eventualmente, no periodonto de sustentação, mastócitos foram observados entre as fibras colágenas próximas a estruturas vasculares.

As áreas selecionadas para as observações, a nível de microscopia eletrônica, apresentavam estruturas vasculares, - fibras de colágeno, neutrófilos, fibroblastos e eosinófilos. Os eosinófilos se destacavam pelos característicos grânulos cito - plasmáticos elipsóides, contendo, na porção central, material - cristalóide mais eletrodense que o restante da matriz do grânulo (Fig.06). Grânulos citoplasmáticos pequenos, com conteúdo ho - mogêneo, também foram observados frequentemente. Em todos os ca - sos estudados, grânulos de eosinófilos foram observados entre - as fibrilas de colágeno e eosinófilos próximos apresentavam ca - racterísticas sugestivas de desgranulação (Figs.7,8 e 9). Muí - tos dos grânulos extracelulares tinham perdido parte da matriz, restando a porção central cristalóide. Os fibroblastos das áre - as observadas, apresentavam retículo endoplasmático bem desen - volvido, com vesículas alargadas contendo matriz de aspecto flo - cular. Fibrilas de colágeno foram observadas no interior de fi - broblastos e, frequentemente, uma mesma célula apresentava 2 ou 3 fibrilas (fig.10). A Fig.11 mostra prolongamento citoplasmáti - co de fibroblasto fagocitando fibrila de colágeno. Não observa - mos colágeno no interior dos eosinófilos, mas, em alguns casos, - havia envolvimento parcial de fibrila de colágeno por porções - citoplasmáticas de eosinófilos (Fig.12). Mastócitos não foram - observados nas áreas inflamadas contendo eosinófilos, nos prepa - rados de microscopia de luz e eletrônica.

EXAMES HEMATOLÓGICOS

As contagens total e diferencial dos leucócitos san - guíneos de ratos, antes e até 70 dias, após a colocação do irri - tante gengival estão apresentadas nas tabelas e gráficos 2,3,4 - e 5. Os resultados sugerem que logo após a colocação da ligadu -

ra houve aumento no número de neutrófilos e diminuição nos linfócitos e eosinófilos. Estas variações devem ter ocorrido pela reação aguda devido ao trauma provocado pela colocação do irritante gengival. Posteriormente, o número de neutrófilos e linfócitos - voltou a níveis normais e houve pequeno aumento na quantidade de eosinófilos.

D I S C U S S Ã O

D I S C U S S Ã O

O único trabalho que encontramos na literatura, pesquisando eosinófilos no conjuntivo gengival extra-vascular, foi o de APPELGREN et alii, 1977. Após exaustivas observações com várias técnicas de fixação e coloração, concluíram que nenhum eosinófilo foi observado em biópsias gengivais humanas. Nas condições usadas no presente trabalho, eosinófilos foram observados no tecido gengival de ratos do grupo controle e, em número crescente, em todos os grupos experimentais, até 45 dias. Nos vários períodos experimentais, houve acentuada variação do número de eosinófilos entre animais de um mesmo grupo. Este fenômeno torna-se de difícil explicação, visto que não estão esclarecidos os mecanismos quimiotáticos que estimularam a migração destas células para o tecido gengival. Queremos salientar, entretanto, que o objetivo principal deste trabalho é o de demonstrar que eosinófilos podem migrar para o tecido gengival e fazer parte do infiltrado inflamatório nas diferentes fases da evolução da doença periodontal provocada, experimentalmente, em ratos.

KOENIG et alii, 1982, relataram que fatores quimiotáticos para eosinófilos podem ser liberados por neutrófilos humanos e por mastócitos de ratos. Entretanto, neste trabalho, na gengiva de ratos, não foi possível correlacionar a presença de eosinófilos e mastócitos, pois estes últimos raramente foram encontrados nas áreas de inflamação. Estes resultados representam, presentemente, um impedimento à extrapolação para a gengiva, de uma associação entre eosinófilos e mastócitos, que tem sido descrita em reações de hipersensibilidade imediata (WELLER e GOETZL 1979). É possível, entretanto, que os eosinófilos estejam participando de reações imunológicas por mecanismos não dependentes de mastócitos. Está bem estabelecido que, na polpa dental normal e na inflamada, raramente são encontrados mastócitos (ZACHRISSON 1971), e os eosinófilos constituem-se em componentes importantes na resposta inflamatória de muitos casos de pulpites. Fatores quimiotáticos para eosinófilos, independentes de mastócitos devem ser gerados na polpa dental, e provavelmente isto também o -

corra na gengiva. No rato um fator quimiotático para eosinófilos pode ser liberado por mastócitos e também por leucócitos mononucleares (KOENIG et alii, 1982).

Pesquisas em animais, (JOHNSON, 1975 - LINDHE et alii 1975, SCHWARTZ, 1914) e em seres humanos (LOE, et alii, 1965; NORMAN et alii, 1979) demonstram que o acúmulo de placa e as modificações de sua composição são fatores relacionados com o desenvolvimento da doença periodontal inflamatória crônica. A estimulação antigênica da placa pode levar à formação, no tecido gengival, de imune complexos, (SCHLUGER, et alii, 1981). Estes complexos são capazes de atrair eosinófilos, que provavelmente os fagocitam, (ANDERSON e SCOTTI; 1976). Além da participação nas reações imunológicas os eosinófilos poderiam ter outras funções no tecido gengival. Até aos 30 dias, após colocação da ligadura, o quadro histológico foi o de uma inflamação intensa, com desorganização e destruição do tecido conjuntivo fibroso e do tecido ósseo. Posteriormente, houve diminuição na intensidade da reação inflamatória. Isto parece paradoxal, mas nas amostras dos períodos experimentais maiores de 30 dias, os eosinófilos localizavam-se principalmente nas áreas subjacentes à inflamação. Nestes períodos, a doença periodontal já se apresentava em estágio avançado, com comprometimento das estruturas periodontais de sustentação. Nestas circunstâncias, a regeneração também está ocorrendo nas doenças gengivais e periodontais ativas, pois são processos crônicos. A presença de eosinófilos em quantidade significativa no foco inflamatório indicaria fases de resolução e cura do processo, (CAMERON, 1969). Entretanto, na doença periodontal estudada, o quadro geral histológico tende a se perpetuar, devido à persistência dos irritantes gengivais. Nestas áreas, os eosinófilos poderiam estar, concomitantemente, de alguma forma, relacionados com a síntese e/ou degradação de fibras, pois de acordo com BASSET et alii, 1977, em ratos há uma associação entre eosinófilos e o processo de síntese de colágeno.

A diferença quantitativa e qualitativa na composição da placa poderia ser uma das explicações para a variabilidade do número de eosinófilos em gengiva de diferentes animais de um mesmo grupo. Pode-se, ainda, considerar a possibilidade de que a ra

ção utilizada, por causa de algum componente seu ou por influir na composição da placa dental, possa condicionar a natureza de infiltrado inflamatório e, conseqüentemente, influir nos mecanismos de defesa e de destruição do periodonto. Como os eosinófilos estavam presentes no infiltrado inflamatório crônico da gengiva de rato, pode-se inferir que estes leucócitos participam direta ou indiretamente na evolução da doença periodontal de ratos. Após o período de 90 dias, tempo usado neste trabalho eosinófilos foram facilmente caracterizados em microscopia de luz tomando-se o cuidado de corar o tecido intensamente com hematoxilina e fracamente com eosina. O infiltrado inflamatório estava restrito ao conjuntivo subjacente ao epitélio do sulco gengivo-dental, agora transformado em bolsa periodontal, e eosinófilos foram observados na área inflamada e no conjuntivo mais profundo, entre as fibras de colágeno.

A ração, usada na alimentação dos animais, pode conter; eventualmente, fatores quimiotáticos para eosinófilos. Tais fatores poderiam fazer parte da composição da placa dental e difundir-se ao conjuntivo subjacente, através do epitélio gengival não queratinizado da junção dento-gengival. Este mecanismo, é possível, visto que o epitélio gengival não queratinizado é altamente permeável, (McDOUGALL, 1971; TOLO, 1971; SCHWARTZ et alii - 1972, ALFANO et alii, 1977). Se a presença de eosinófilos no tecido gengival for conseqüência de substâncias presentes na ração, a resposta inflamatória poderia configurar um quadro de reação imuno-alérgica, capaz de influir na evolução da doença periodontal de ratos, que têm sido um modelo experimental de uso frequente. Contudo, em gengivite experimental de natureza imunológica em ratos, por injeções intra-gengivais de albumina bovina, (SELA et alii, 1977), não relataram a presença de eosinófilos. Como ocorre na orofaringe e intestinos, (ROSS e KLEBANOFF, 1966; BEESON e BASS, 1977), observamos eosinófilos migrando através do epitélio gengival, provavelmente sendo, também, um dos mecanismos de eliminação dos eosinófilos do tecido conjuntivo.

Como o metabolismo de colágeno é alto no tecido periodontal (CARNEIRO e FAVA DE MORAES, 1965), e como os eosinófi -

los estavam entre as fibras periodontais, é atraente a hipótese de sua participação nos processos de síntese e degradação de colágeno, (BASSET et alii, 1977), observaram aumento de eosinófilos no processo de reparo na pele de rato. Como na pele, na gengiva os eosinófilos estavam predominantemente em áreas de organização tecidual. O grande número de grânulos de eosinófilos no conjuntivo extra-vascular e as modificações ultraestruturais que apresentaram sugerem que o material enzimático estava sendo liberado para atuar no conjuntivo adjacente. A desgranulação de eosinófilos em áreas ricas em colágeno foi descrita na pele de rato (BASSET et alii, 1977) e no útero de rata (ROSS e KLEBANOFF 1966). Colagenase presente nos grânulos dos eosinófilos seria a substância ativa no catabolismo de colágeno, entretanto não existem evidências que suportem a participação destas células, na síntese de colágeno. Como é postulado por (BASSET et alii, 1977), a colagenase dos eosinófilos atuaria nas fibrilas de colágeno, que seriam posteriormente fagocitadas pelos fibroblastos. Os resultados de Marchi e Leblond (em publicação) demonstram, claramente, que as fibrilas de colágeno observadas no citoplasma dos fibroblastos não representam material sintetizado intracitoplasmaticamente. Assim, sendo, é possível que os aspectos mostrados nas figuras, 9, 10, 11 e 12, representem uma cooperação entre eosinófilos, na degradação de colágeno, e fibroblastos, na fagocitose. Não encontramos evidências que suportassem a possibilidade de fagocitose de colágenos pelos eosinófilos.

Atuando no metabolismo de colágeno ou em mecanismos imunológicos, a função dos eosinófilos na gengiva de rato e os mecanismos quimiotáticos envolvidos precisam ser esclarecidos por estudos adicionais.

FIGURAS

TABELA 1

DIAS APÓS A COLOCAÇÃO DO IRRITANTE GENGIVAL	GENGIVA DA FACE MESIAL DO 1º MOLAR INFERIOR	PAPILA INTERDENTAL ENTRE OS 1º E 2º MOLARES INFERIORES
Zero	1,33 ± 1,41	2,15 ± 1,29
8	2,99 ± 2,05	7,74 ± 6,67
20	10,16 ± 8,18	17,00 ± 12,54
30	16,58 ± 11,36	25,40 ± 9,85
45	27,24 ± 5,27	24,32 ± 9,58
70	26,58 ± 7,17	25,75 ± 18,30
90	20,83 ± 5,69	27,33 ± 20,31

Número total de eosinófilos na gengiva da face mesial do 1º molar inferior de rato e na papila interdental entre os 1º e 2º molares inferiores. O tempo zero corresponde ao 1º molar do lado direito que não recebeu irritante gengival. Para o cálculo das médias e desvios padrões de cada grupo foram usados 4 animais.

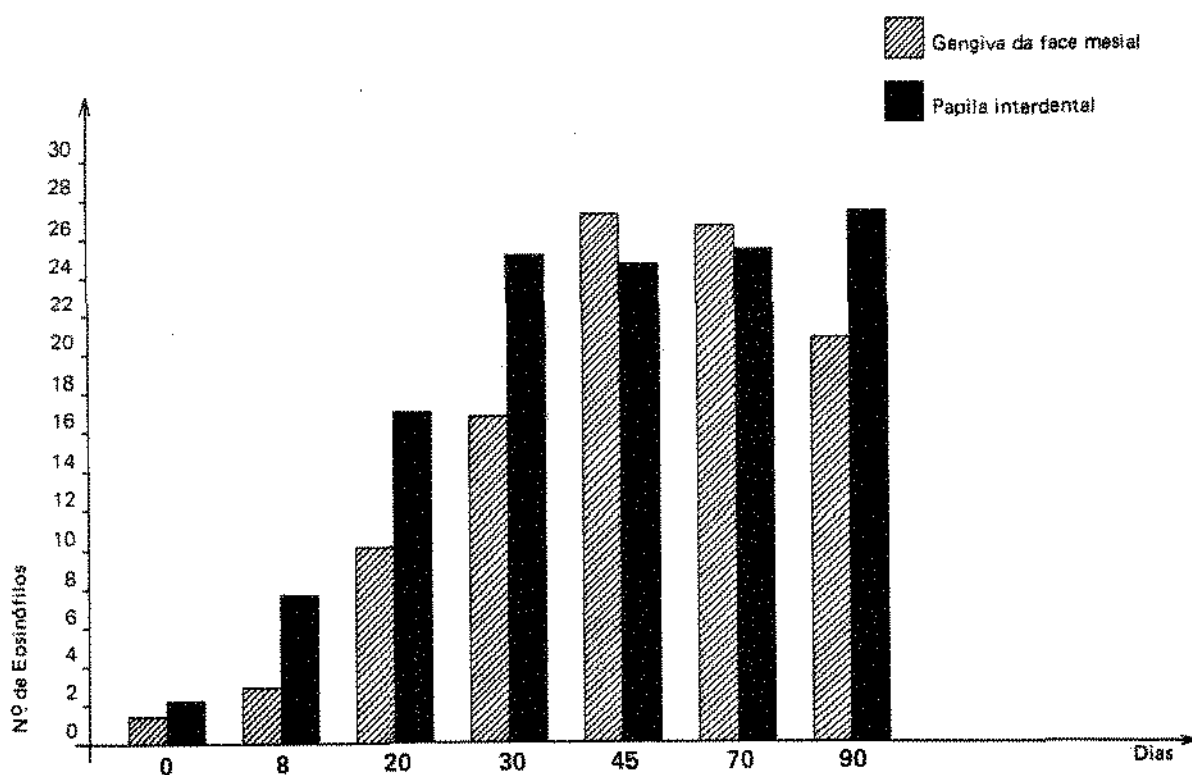


GRÁFICO 01

Número total das médias dos eosinófilos encontrados na gengiva da face mesial do 1º molar inferior e na papila interdental entre 1º e 2º molares inferiores do rato.

TABELA 2

DIAS	MÉDIAS
1ª	9.630 ± 3852,3
3ª	12.040 ± 2891,8
5ª	11.210 ± 2559,3
7ª	11.860 ± 3796,3

Média dos valores globais de leucócitos por mm^3 de sangue em ratos normais.

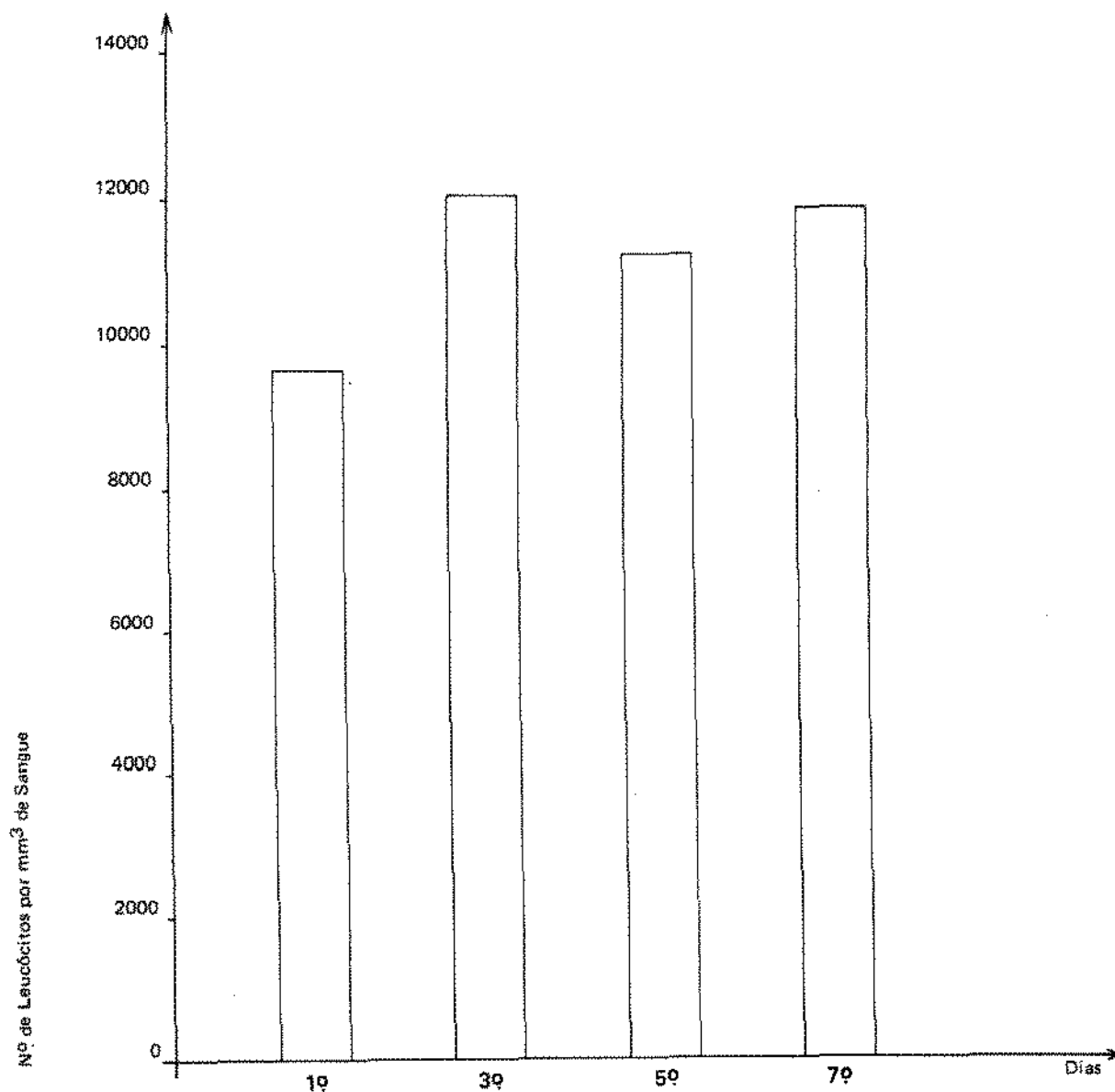


GRÁFICO 2

Representação das médias globais dos leucócitos por mm^3 de sangue em ratos normais.

TABELA 3

DIAS	LEUCÓCITOS	MÉDIA
1º	Neutrófilo (N)	2010 ± 1223,0
	Eosinófilo (E)	182 ± 91,6
	Basófilo (B)	00 ± 00,0
	Linfócito (L)	7276 ± 2648,3
	Monócito (M)	162 ± 87,3
3º	Neutrófilo (N)	2665 ± 882,7
	Eosinófilo (E)	214 ± 103,0
	Basófilo (B)	00 ± 00,0
	Linfócito (L)	8917 ± 2148,6
	Monócito (M)	244 ± 154,2
5º	Neutrófilo (N)	2861 ± 955,7
	Eosinófilo (E)	189 ± 92,6
	Basófilo (B)	00 ± 00,0
	Linfócito (L)	7905 ± 1777,3
	Monócito (M)	255 ± 99,8
7º	Neutrófilo (N)	2704 ± 1060,1
	Eosinófilo (E)	209 ± 131,3
	Basófilo (B)	00 ± 00,0
	Linfócito (L)	8755 ± 2812,2
	Monócito (M)	192 ± 90,8

Média dos valores absolutos observadas por contagem diferencial dos leucócitos em ratos normais.

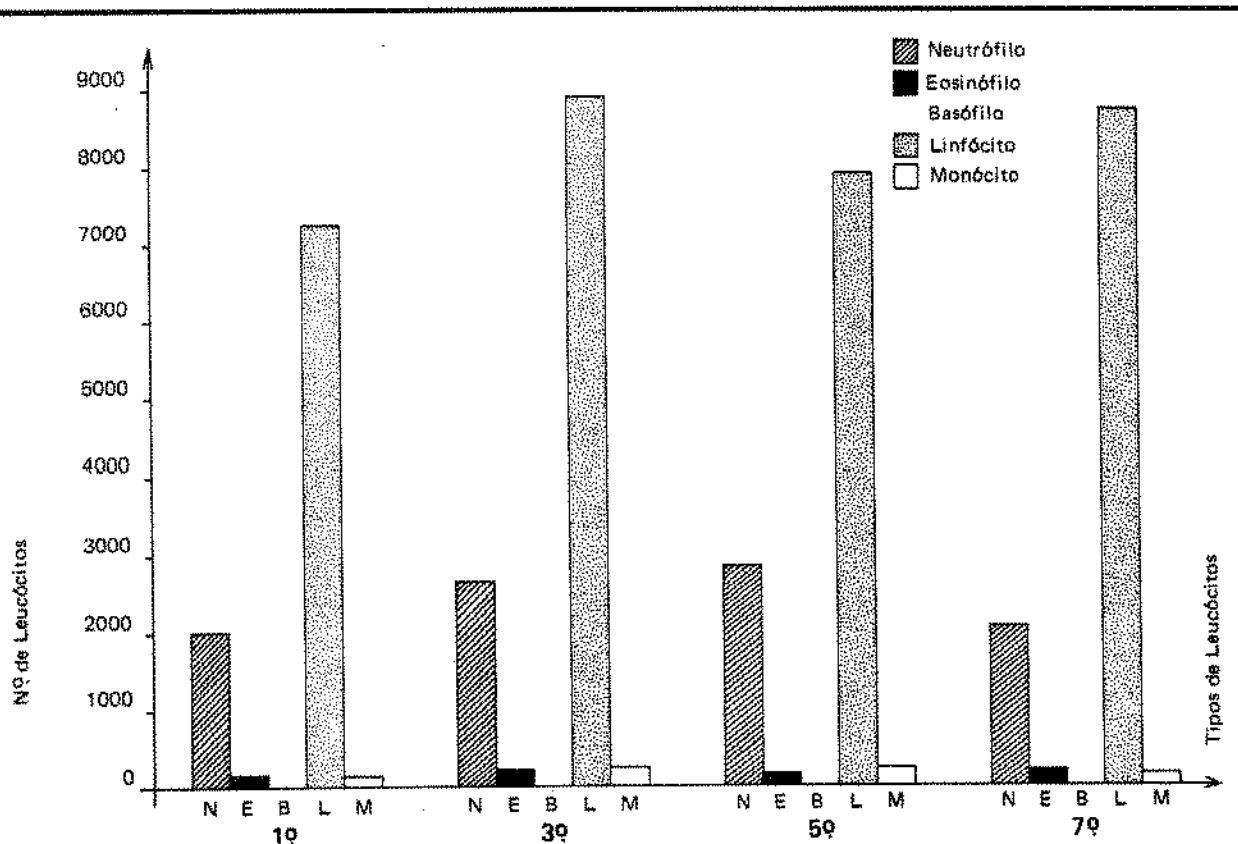


GRÁFICO 3

Média dos valores absolutos observadas por contagem diferencial dos leucócitos em ratos normais.

TABELA 4

DIAS	MÉDIAS
1º	12.460 ± 3195,0
3º	11.240 ± 4195,6
5º	11.600 ± 4202,4
7º	9.740 ± 2600,6
14º	8.580 ± 1425,5
21º	8.500 ± 1307,7
28º	8.180 ± 1010,9
35º	8.260 ± 1205,4
70º	9.280 ± 1617,7

Média dos valores globais de leucócitos por mm^3 de sangue em ratos com ligadura.

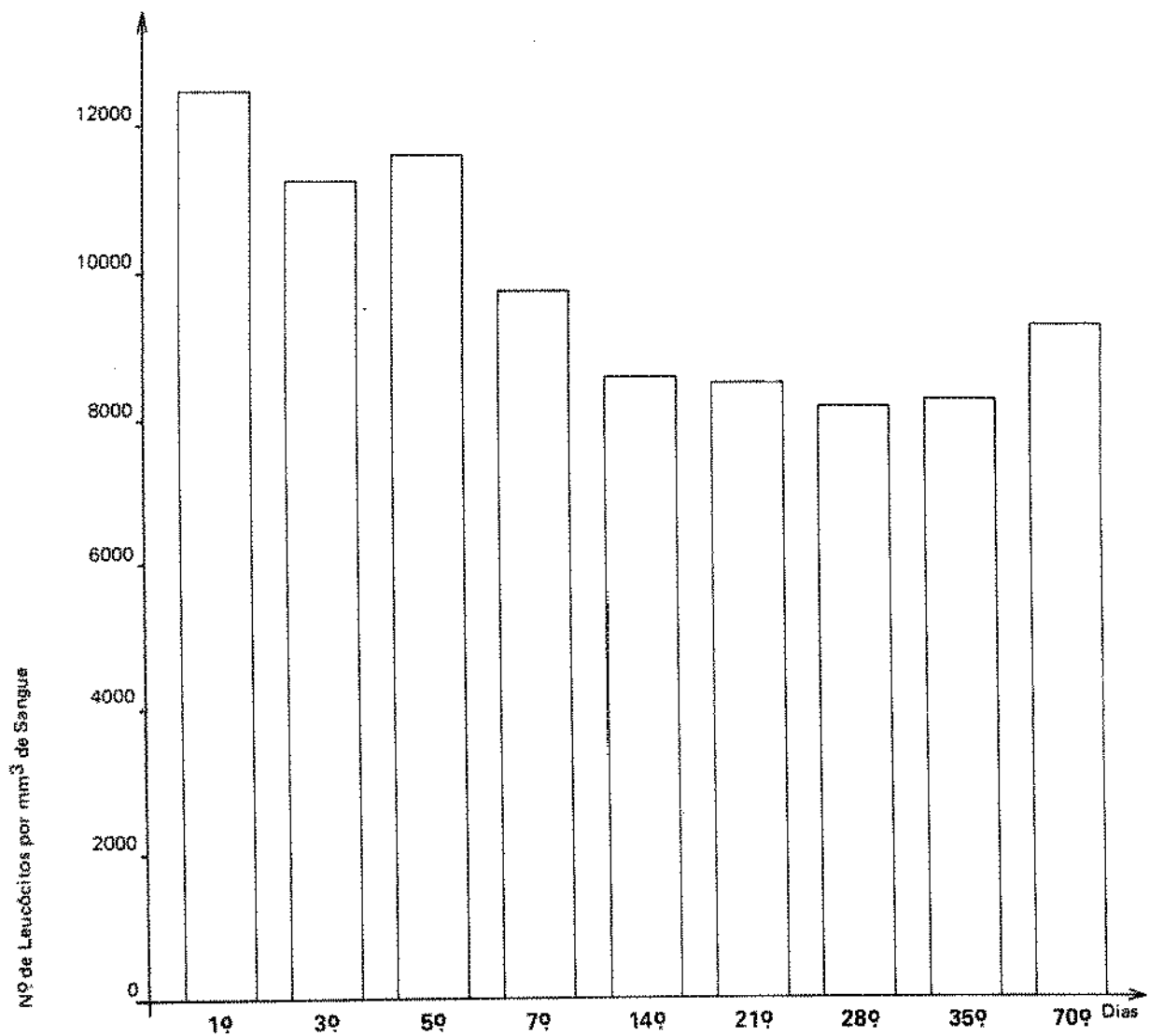


GRÁFICO 4

Representação das médias globais dos leucócitos por mm^3 de sangue em ratos com ligadura.

TABELA 5

DIAS	LEUCÓCITOS	MÉDIAS	DIAS	LEUCÓCITOS	MÉDIAS
19	N	8337 ± 2626,9	219	N	2113 ± 544,6
	B	68 ± 64,4		B	499 ± 455,3
	L	00 ± 00,0		L	00 ± 00,0
	M	3886 ± 876,2		M	5787 ± 576,8
39	N	169 ± 98,2	289	N	101 ± 76,3
	N	2192 ± 726,4		N	2210 ± 464,5
	B	415 ± 262,2		B	330 ± 88,2
	L	00 ± 00,0		L	00 ± 00,0
59	L	8478 ± 3417,8	359	M	5507 ± 498,1
	M	155 ± 76,7		M	133 ± 54,2
	N	1804 ± 177,6		N	2332 ± 492,8
	B	429 ± 310,0		B	332 ± 107,5
79	L	00 ± 00,0	709	L	00 ± 00,0
	M	9151 ± 3367,0		M	5449 ± 652,6
	N	216 ± 104,7		M	147 ± 39,2
	N	2118 ± 908,7		N	2737 ± 429,9
149	B	123 ± 93,0		B	377 ± 47,4
	L	00 ± 00,0		L	00 ± 00,0
	M	7181 ± 2606,3		M	5976 ± 1242,4
	M	318 ± 189,7		M	190 ± 57,2
	N	1919 ± 784,4			
	B	458 ± 341,4			
	L	00 ± 00,0			
	M	6044 ± 974,7			
	M	159 ± 82,4			

Média dos valores absolutos observadas por contagem diferencial dos leucócitos em ratos com ligaduras.

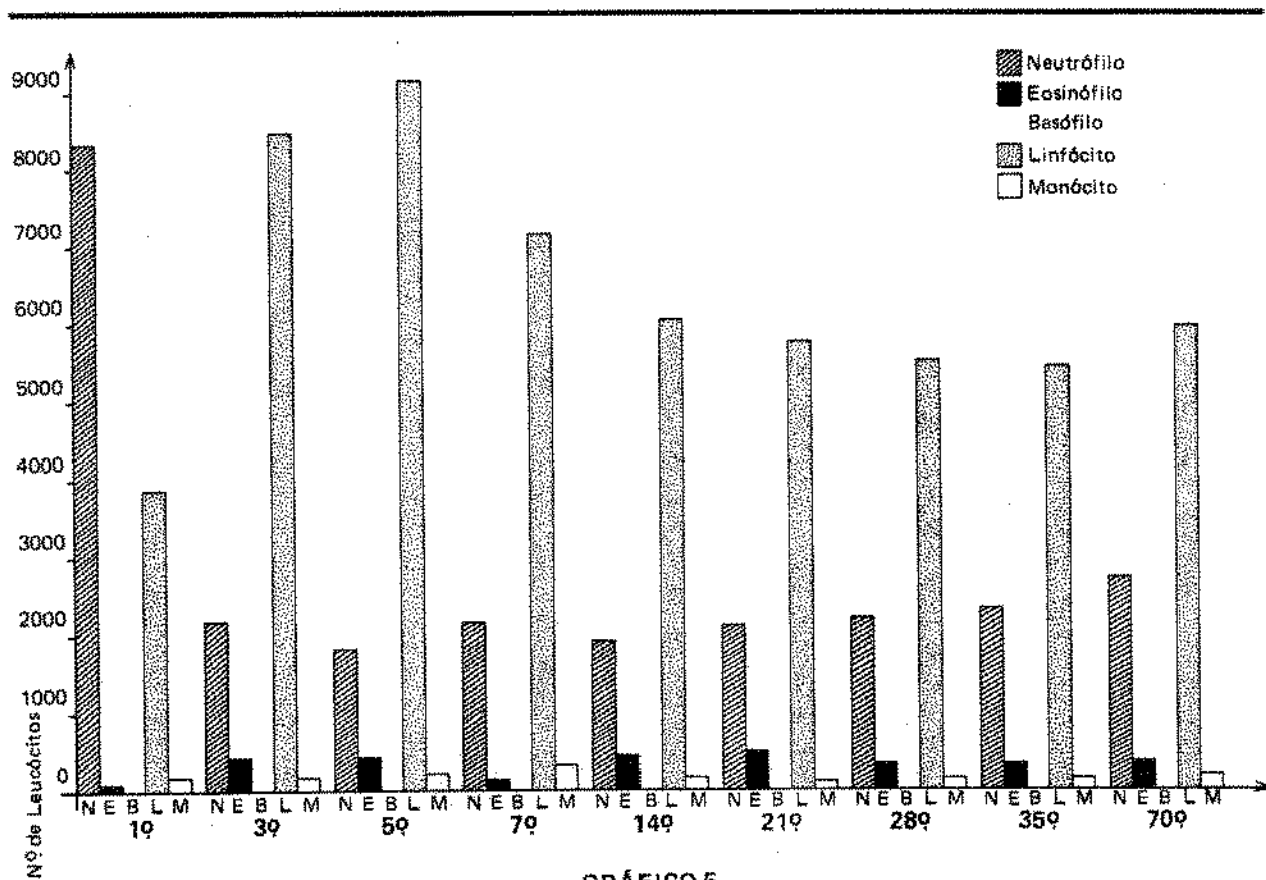


GRÁFICO 5

Média dos valores absolutos observadas por contagem diferencial dos leucócitos em ratos com ligaduras.

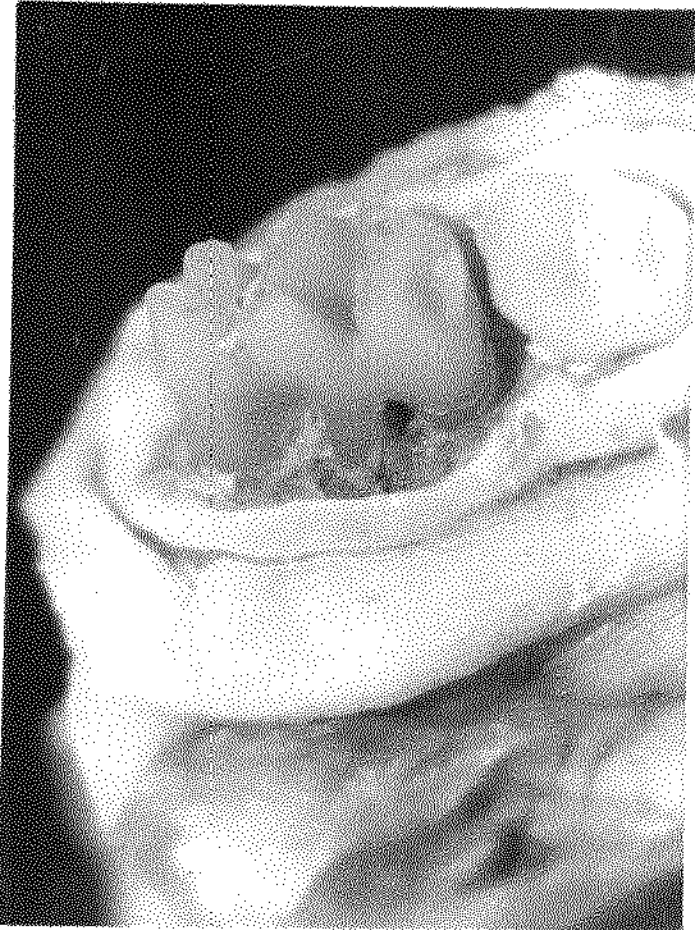


FIG.01 - Aspecto macroscópico da mandíbula de rato 90 dias após a colocação do irritante gengival na região cervical do 1º molar inferior. As bifurcações estão expostas e a papila interdental perdeu o aspecto de pirâmide. 12X.

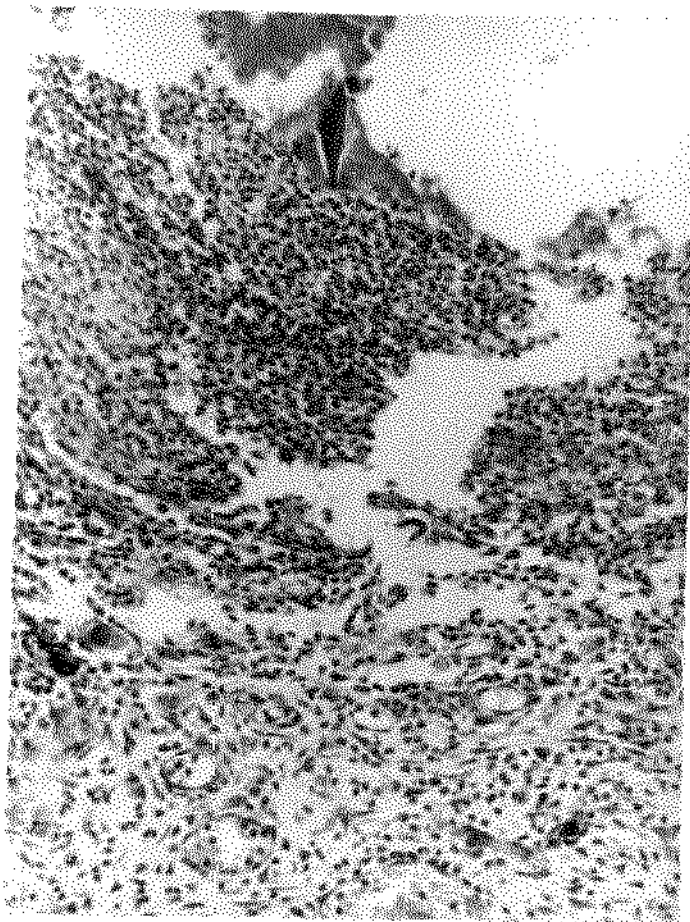


FIG.02 - Papila interdental entre os 19 e 29 molares inferiores de rato, oito dias após a colocação de irritante gengival. Os neutrófilos são as células predominantes e é reduzido o número de eosinófilos. H&E. 100X.

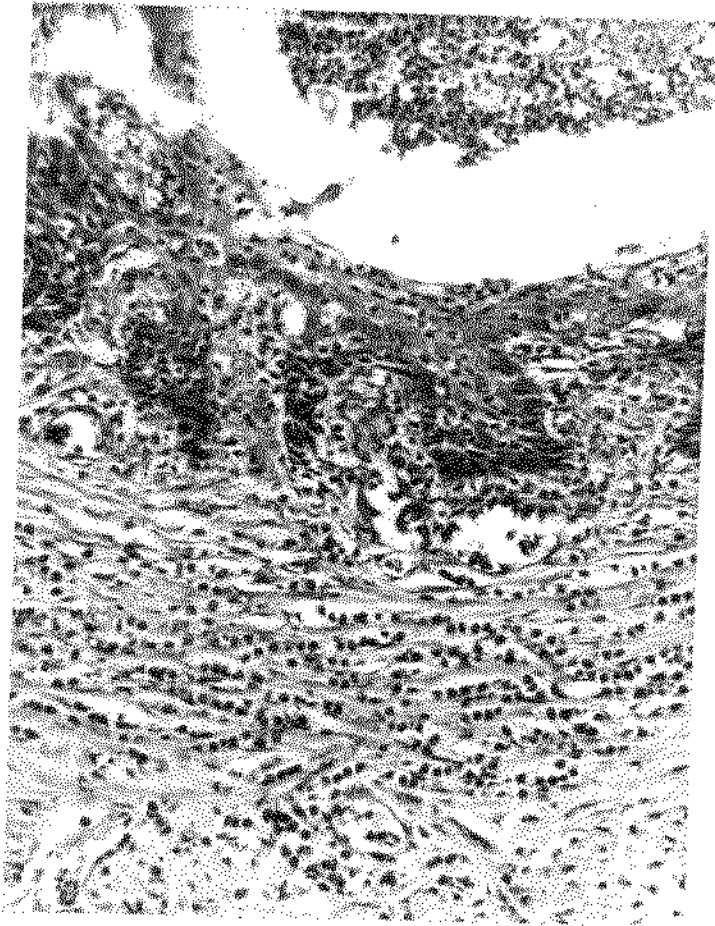


FIG.03 - Papila Interdental entre os 19 e 29 molares inferiores 90 dias após o irritante gengival. O epitélio está espessado, infiltrado de neutrófilos e não queratinizado. Abaixo do epitélio as células-inflamatórias predominantes, são neutrófilos e no córion mais profundo o infiltrado é principalmente de eosinófilos. H&E. 100X.



FIG.04 - Papila interdental entre os 19 e 29 molares inferiores 90 dias após o irritante gengival. Entre as fibras de colágeno observa-se grande número de eosinófilos. H&E. 260X.

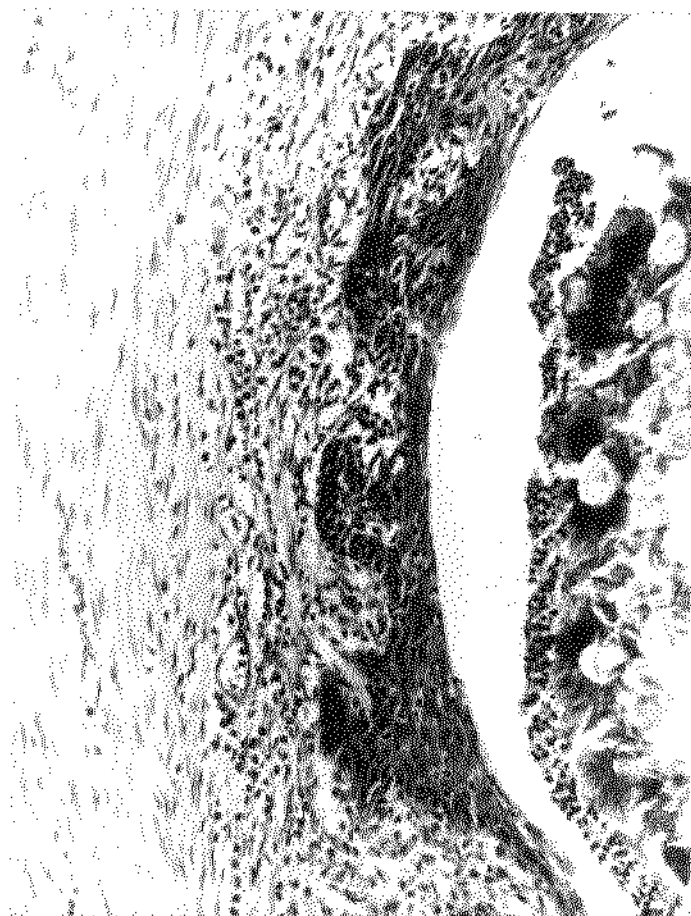


FIG.05 - Gengiva de rato 90 dias após a colocação do irritante gengival. O fio de algodão está envolto por bactérias e neutrófilos. O epitélio contém leucócitos no seu interior e no conjuntivo inflamado há predominância de eosinófilos. H&E. - 120X.



FIG.06 - Aspecto ultraestrutural de eosinófilos de rato entre fi
brilas de colágeno. No citoplasma estão os característi
cos grânulos elipsóides contendo material cristalóide -
na porção central. 16.000X.



FIG.08 - Eosinófilos com grânulos citoplasmáticos e entre as fi
brilas de colágeno grande quantidade de grânulos extra-
citoplasmáticos. A morfologia dos grânulos extracelulal
res é variada. 5.000X.



FIG.07 - Citoplasma de eosinófilo com evidentes características de desgranulação. Alguns grânulos têm aspecto homogêneo e outros perderam parte da matriz, restando o material cristalóide. 16.000X.

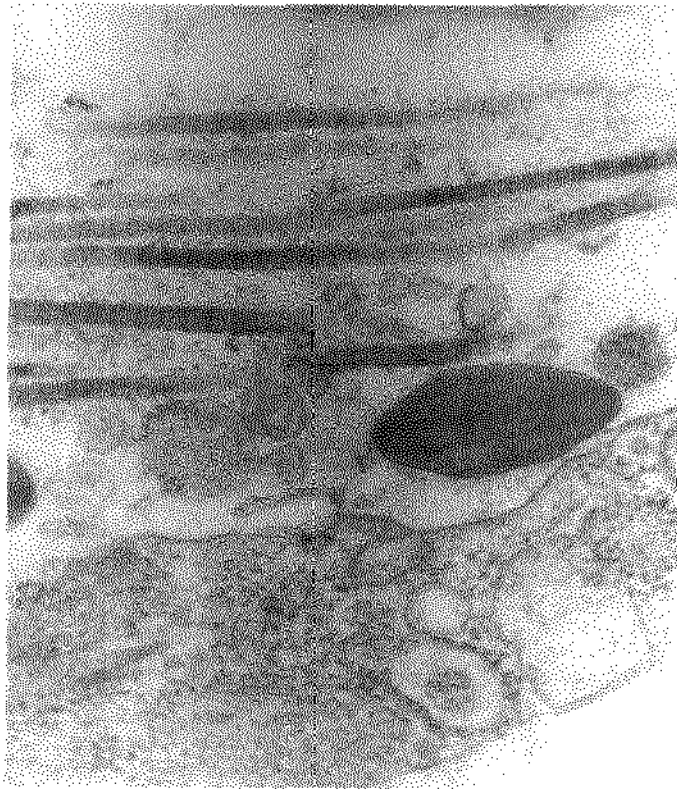


FIG.09 - Grânulo de eosinófilo entre fibrilas de colágeno e prolongamentos citoplasmático de fibroblasto. A forma elipsóide, o conteúdo da matriz e o cristalóide central - sugerem que o grânulo está íntegro. 30.000X.



FIG.10 - Fibroblasto de gengiva de rato com retículo endoplasmático dilatado e fibrila de colágeno num vacúolo intracelular. 16.000X.



FIG. II - Prolongamento citoplasmático de fibroblasto fagocitando fibrilas de colágeno. O bandeamento característico do colágeno é evidente. 28.000X.



FIG.12 - Aspecto ultraestrutural de eosinófilo de rato com fibrila de colágeno envolvida parcialmente pelo eosinófilo. 20.000X.

RESUMO E CONCLUSÕES

RESUMO E CONCLUSÕES

Eosinófilos estavam presentes na inflamação gengival provocada experimentalmente em ratos, colocando-se ligadura com fio de algodão na região cervical dos primeiros molares inferiores. O número de eosinófilos aumentou progressivamente até 30 dias após a colocação do irritante gengival, não havendo posterior modificações quantitativas. Inicialmente, os eosinófilos estavam localizados nas áreas inflamadas subjacentes ao epitélio e, depois de 30 dias, situavam-se no córiom mais profundo, entre as fibras de colágeno. Mastócitos raramente foram observados no tecido periodontal próximo às áreas inflamadas, indicando que estas células não atuaram diretamente na migração dos eosinófilos. Além da participação dos eosinófilos, em mecanismos imunológicos sugere-se que possam estar envolvidos na síntese e degradação de fibras colágenas.

Com bases nos resultados deste trabalho, concluimos-que:

a) Eosinófilos estavam presentes na doença periodontal provocada experimentalmente em ratos.

b) O número de eosinófilos aumentou após a colocação do irritante gengival até aos 45 dias.

c) Não foi constatada a presença de mastócitos na área da doença periodontal inflamatória experimentalmente provocada.

Unitermos - Eosinófilos - doença periodontal - inflamação.

S U M M A R Y

S U M M A R Y

Gingival inflammation provoked experimentally in rats presented eosinophils in the cellular infiltrate. Eosinophil number increased progressively to a peak at 30 days and subsequently there was no quantitative alteration.

Initially eosinophils were found in inflamed areas underneath the gingival epithelium and in latter periods were more numerous in deep corion among the collagen fibers. The extra-cytoplasmic granules were among the collagen fibrils and close - to fibroblast which phagocytosed collagen. Mast cells rarely were found in the vicinity of inflamed areas indicating that these cells did not participate in eosinophil migration. It is suggested that eosinophil collagenase and other cytoplasmic enzymes act on the metabolism of rat.

Key Words - Eosinophils - Periodontal disease - In -
flammation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFANO, M.C.; CHASEUS, A.T. e MASI, C.W. - Autoradiographic Study of the penetration of radiolabelled dextrans and inulin through nonkeratinized oral mucosa in vitro. J. Period. Res. 12:368-377, 1977.
- ANDERSON, W.A.D. e SCOTTI, T.M. - Sinótese de Patologia. 2^a Ed. Bras. Rio de Janeiro. Ed. Cultura Médica Ltda, 1976.
- APPELGREN, R., KAMINSKI, E.J., OGLESBY, R.J., e ROBINSON, P.J. - Gingivitis and eosinophils. J. Dent. Res., 56:546, 1977.
- AUSTEN, K.F. - Homeostasis of effector systems which can also be recruited - for immunologic reactions. J. Immunol. 121:793-805, 1978.
- BAHAMER, R.L. & JOHNSTON, R.B. - Metabolic and bactericidal activities of human eosinophils. British journal of Haematology. 20:277, 1971.
- BASS, D.A. e SZEJDA, P. - Eosinophils versus neutrophils in host defense: - Killing of new-born larvae of *Trichinella spiralis* by human granulocytes - in vitro. J. Clin. Invest. 64:14-15-1422, 1979.
- BASSET, E.G., BAKER, J.R., e SOUZA, P. - A light microscopical study of healing dermal wounds in rats, with special reference to eosinophils leucocytes - and to the collagenous fibres of the periwound areas. Br. J. Exp. Path. - 58:581-605, 1977.
- BEESON, P.B. e BASS, D.A. - The eosinophil. Philadelphia, W.B. Saunders, 1977.
- BUTTERWORTH, A.E., STURBOCK, R.F., HOUBA, V., MAHMOUD, A.A.F., SHER, A. e REES, P. H., - Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistosome. Nature, 256:727-729, 1975.

- CAMERON, R. - Inflamação e reparação. In Robbins, S.L. Patologia. 3.^a edição - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969.
- CARNEIRO, J. e FAVA DE MORAES, F. - Radioautographic visualization of the collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. Arch. Oral Biol. 10:833-848, 1965.
- CATANZARO GUIMARÃES, SÉRGIO A. - Patologia Básica da Cavidade Bucal. 1.^a ed. - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.
- CLARK, R.A.F., GALLIN, J.I., e KAPLAN, A.P. - The selective eosinophil chemotactic activity of histamine. J. Exp. Med. 142:1462-1476, 1975.
- CLINE, M.J. et alii - Phagocytosis by human eosinophils; Blood; 32:922, 1968.
- ERLICH, P. - Uber die Spezifischen Granulationem des Blutes. Arch. Anat. Physiol 571-579, 1879. Apud Olsson, I e Venge, P. Allergy, 34:353-367, 1979.
- FOOT, E.C. - Eosinophil turnover in the normal rat. Br. J. Haematol. 11:439 - 445, 1965.
- GOETZL, E.J. - Modulation of human eosinophil polymorphonuclear leukocyte migration and function. Am. J. Pathol. 85:419-435, 1976.
- _____, WELLER, P.F., e VALONE, F.H. - Biochemical and functional bases of the regulatory and protective roles of the human eosinophil. Advances in Immunology. (14) Edited by G. Weissman, B. Samuelson, R. Paoletti, New York, Raven Press, pp.157-167, 1979.
- HUDSON, G. - Quantitative study of the eosinophil granulocytes. Semin. Hematol. 5:166-186, 1968
- IVANYI, L., WILTON, J.M.A., e LEHNER, T. - Cell-mediated immunity in periodontal disease: cytotoxicity, migration inhibition and lymphocyte transformation studies. Immunology, 22:141-145, 1972.

- JOHNSON, I.H. - Effects of local irritation and dextran and sulphate administration on the periodontium of the rat. J.Periodont.Res. 10:332-345, 1975
- KAY, A.B. - The eosinophil in infectious diseases. Journal of Infectious Diseases, 129-606, 1974.
- _____, - Function of the Eosinophil Leucocytes - British Journal of Haematology, 33:313-17, 1976.
- KOENIG, W. KROEGEL, C. e PFEIFFER, P. - Modulation of the eosinophil chemotactic factor released from various cells and their subcellular components - by phospholipids. Biol.Abst., 73:767, 1982.
- LINDHE, J., HAMP, S.E. e LOE, H. - Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. J.Period.Res. 10:243-245, 1975.
- LOE, H., THEILADE, E. e JENSEN, S.B. - Experimental gingivitis in man. J.Periodontal.Res. 36:177-187, 1965.
- MAHMOUD, A.A.F., WARREN, K.S. e PETERS, P.A. - A role for the eosinophil in acquired resistance to Schistosoma Mansoni infection as determined by an eosinophil serum. J.Exp.Med.; 142:805-813, 1975.
- MARCHI, F. e LEBLOND, C.P. - Collagen biogenesis and assembly into fibrils, as shown by ultrastructural and ³H-proline radiographic studies on the fibroblast of the rat foot pad. Aceito para publicação no Am.J.Anat.
- MCDUGALL, W.A. - Penetration pathways of a topically applied foreign protein into rat gingiva. J.Periodont.Res. 6:89-99, 1971.
- MELLO, A. - Fisiologia Experimental Básica. São Paulo, Ed.Norograf., 1970.
- MICKENBERG, I.D.; ROOT, R.K. & WOLF, S.M. - Bactericidal and Metabolic properties of Human eosinophils; Blood; 39:67, 1972.

- NORMAN; M.E., BAENI, P.C., TSAI, C.C., STOLER, N. McARTHUR, W.P. e TAICHMAN, N.S. - Studies of host responses during experimental gingivitis in Humans.; J. Period. Res.; 14:361-369, 1979.
- PAGE, R.C. e SCHROEDER, H.E. - The Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. Lab. Invest. 33:235-248, 1976.
- ROSS, R. e KLEBANOFF, S.J. - The eosinophil leukocyte. Fine structure studies of changes in the during the estrous cycle. J. Exp. Med.; 124:653-659, 1966.
- SARAN, R. - Observations on the phagocytic activities of Eosinophils. Indian. J. Med. Res.; 63:10-1486-88, 1975.
- SCHLUGER, S., YOUDELIS, R.A. e PAGE, R.C., - Periodontia. Fenômenos Básicos, Tratamento e Inter-Relações Oclusais e Restauradoras. 1.^a edição em português. Rio de Janeiro, Ed. Interamericana, 1981.
- SCHWARTZ, E. - Die Lehre von der allgemeinen und orlichen eosinophilie ergebn dallg path u path Anat. 17:137-787, 1914. Apud Beeson, P.B. e Bass, D.A. - The Eosinophil. Philadelphia, W.B. Saunders, 1977.
- SCHWARTZ, J., STINSON, F.L. e PARKER, R.B. - The passagem of tritiated bacterial endotoxin across gingival crevicular epithelium. J. Periodontal. 43:270-276 1.972.
- SELA, J., ROSEMAN, E., SCHLECHTER, D. e BOSS, J.H. - Experimental allergic gingivitis. II. Development of chronic gingivitis or local non-reactivity after multiple challenges in the rat. J. Period. Res.; 12:467-478, 1977.
- SPRY, C.J.F. - Mechanism of eosinophilia. VI. Eosinophil mobilization. Cell - Tissue Kinet. 4:365-374, 1971.
- TEIR, H., RYTOMAA, T., CEDERBERG, A. e KIVINIEMI, K. - Studies on the elimination of granulocytes in the intestinal tract of rats. Acta Pathol. Scand.; 59:311-324, 1963.

TOLO,K. - A study of the permeability of gingival pocket epithelium to albumin in guinea pigs and Norwegian pigs. Arch.Oral Biol.16:881-888. 1971.

WELLER,P.F. e GOETZL,E.J. - The regulatory and effector roles of eosinophils. Adv.Immunol.; 27:339-371, 1979.

ZACHRISSON,B.U. - Mast Cells in human dental pulp. Archs Oral Biol. 16:555-556, 1971.