UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

DENISE CARLETO ANDIA

# CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO OSSO ALVEOLAR DE RATOS TRATADOS COM CICLOSPORINA-A OU TACROLIMUS

ARARAQUARA
2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

DENISE CARLETO ANDIA

# CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO OSSO ALVEOLAR DE RATOS TRATADOS COM CICLOSPORINA-A OU TACROLIMUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista - UNESP, para a obtenção título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

**ARARAQUARA**

**2006**

Andia, Denise Carleto
Características morfológicas do osso alveolar de ratos tratados com ciclosporina-A ou tacrolimus / Denise Carleto Andia. – Araraquara: [s.n.], 2006
116 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.
Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

1. Ciclosporina 2. Tacrolimo 3. Osso e Ossos 4. Imunossupressores I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Denise Carleto Andia

# CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO OSSO ALVEOLAR DE RATOS TRATADOS COM CICLOSPORINA-A E TACROLIMUS

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

2º examinador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior

3º examinador: Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo

*Araraquara, 20/01/2006.*

# Denise Carleto Andia

*Nascimento*: 16 de Outubro de 1972 – Jales/SP

*Filiação*: Braz Baratela

Neuza Carleto

*1990-1993*: Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

*1995-1996*: Curso de Aperfeiçoamento em Prótese, pela Escola Paulista de Odontologia – Campinas.

*1997-1998*: Curso de Especialização em Dentística Estética e Restauradora, pela Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

*1999-2000*: Curso de Aperfeiçoamento em Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

*2004-2006*: Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Mestrado, pela Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

# Agradecimentos

A Deus, inteligência suprema do Universo,
causa primária de todas as coisas, por permitir
o progresso contínuo de seus filhos.

À minha mãe, Neuza, por ter me recebido como sua única filha nesta existência. Exemplo de mulher forte, batalhadora, sincera, amorosa e acima de tudo justa, sempre. Mostrou-me os caminhos do bem a serem percorridos, o respeito e amor ao próximo, a importância da família e da fidelidade aos meus ideais.

Ao Like, meu companheiro de sempre, impossível imaginar minha vida até aqui sem sua presença. Você é um ser iluminado, raro e especial, com uma capacidade incrível de amar. Sempre digo que é um privilégio conviver com você.

# Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio, por ter me recebido como sua orientada e pela convivência produtiva nestes dois anos. Pesquisador competente e estudioso, sou grata pela oportunidade de aprendizado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, pela contribuição primorosa e imprescindível a esta Dissertação e à minha formação profissional. Obrigada por ter compartilhado comigo seu respeito e dedicação à pesquisa. Mesmo quando você não estava me ensinando, eu estava aprendendo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro em forma de bolsa e à FAPESP, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

Aos Profs. Drs. Joni Augusto Cirelli e Carlos Rossa Junior pela seriedade e competência com que coordenaram o curso de Pós-Graduação em Periodontia.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de sua Diretora, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantônio e Vice-Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Aos docentes do curso de Periodontia, Prof. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof. Dr. Elcio Marcantônio Junior, Profa. Dra. Silvana Perez Orrico, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior e Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli por compartilharem comigo seus conhecimentos em Periodontia.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Periodontia da FOAr-UNESP, obrigada por alimentarem meus sonhos.

Às Professoras Miriam e Elaine, obrigada pelo carinho e atenção nos momentos em que precisei.

Aos amigos do curso de Mestrado em Periodontia, Dani Spi, Dani Zandim, Dé, Fábio, Gabi, Miltinho, Rafa Faeda, Rafa Sartori e Rafaela.

Aos amigos que cursam o Doutorado em Periodontia, Ana Emília, Andréa, Bia, Carla, Cacá, Dani, Fernanda, Fernando, Ishi, Ivy, Josi, Ju Moraes, Ju Rico, Maurício, Pati, Vanessa.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia, Maria do Rosário, Teresinha, Maria José, Cláudia, Regina Lúcia, Telma, Sueli e Toninho pelo carinho, paciência e respeito em todos os momentos.

Aos amigos e companheiros de pesquisa Pati, Cacá e Morgana, que fizeram das horas no Biotério, momentos agradáveis de trabalho: vocês tornaram possível a realização desta pesquisa. Pati e Cacá, que tanto me ensinaram, obrigada pela amizade e pela ajuda sempre que pedi .

Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Profa. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira e Prof. Dr. Carlos Benatti Neto, pelo convívio harmonioso.

Ao José Antônio Zuanon, o Zé, por proporcionar um ambiente de trabalho agradável e com fundo musical de muito bom gosto, pelo corte histológico das peças desta pesquisa, pela paciência infinita com computadores, programas de imagem e sobretudo comigo.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação que, sempre com um sorriso nos lábios, realizam um trabalho sério e competente.

Aos funcionários da Biblioteca da FOAr-UNESP, pela presteza e competência, sem perder a simpatia e à Maria Helena, pela ajuda primorosa na correção desta Dissertação.

Aos funcionários e professores do Departamento de Morfologia, disciplina de Histologia da FOAr-UNESP que me acolheram sempre com muito carinho.

Ao Departamento de Morfologia, área de Histologia da FOP-UNICAMP, ao Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes e a Sra. Eliene A. O. N. Romani, pela disponibilização do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão, atenção e auxílio essenciais à realização de parte desta Dissertação.

À Silvana, que além de professora, tornou-se amiga. A porta da sua sala sempre esteve aberta aos meus questionamentos pessoais e profissionais. Sei que seu carinho por mim é verdadeiro. Vou sentir sua falta.

À Ju Rico, amiga de tantas horas, obrigada pela presença e otimismo, tão necessários hoje em dia.

Débora, minha irmã, preencheu com muito carinho meus momentos em Araraquara com muito amor e alegria. Dividir o lar e minha vida com você, mesmo que por tão pouco tempo, foi um presente de Deus, uma experiência ímpar que levarei sempre comigo. Você merece a felicidade, nada menos do que isso. Vou sentir sua falta.

Gabi, obrigada pelo amor e carinho, sempre. Amizades construídas assim, tão rapidamente mas ao mesmo tempo com tanta solidez, com certeza são por um motivo maior, que ainda não entendemos. Vou sentir sua falta.

Dani, obrigada pelas conversas, pela confiança, pelas risadas, por sua presença leve e sempre amiga. Você é uma pessoa rara, de muito valor, não se esqueça disso nunca. Vou sentir sua falta.

Aos meus grandes amigos Alessandra, Patrícia e Eduardo que estiveram mais uma vez ao meu lado, me auxiliando na revisão da língua inglesa.

Aos meus primeiros grandes incentivadores na Periodontia, Profa. Dra. Luciana Machion, Profa. Dra. Ângela Guimarães Martins e Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior:

Lu, trabalhar com você foi uma experiência valiosa e enriquecedora que não pára de dar frutos. Seu amor à Periodontia, sua alegria e energia permanecerão em meu coração por todos os dias de minha vida. Obrigada pelas oportunidades, ensinamentos e amizade.

Jam, minha irmã, trabalhar com você me fez crer na pesquisa feita com honestidade, seriedade e dedicação. Conhecer você me fez crer que verdadeiras amizades podem existir aqui, agora. É perfeitamente possível que elas aconteçam sem nenhum interesse, apenas pelo grande prazer de estar junto, pela grande afinidade. Sabemos que isso é eterno.

Chico, você me deu minha primeira oportunidade na área acadêmica. Sem dúvida, estará para sempre em meu coração; essas coisas eu não esqueço. Exemplo de pesquisador correto, dedicado e esforçado, foi um privilégio e uma honra ter trabalhado com você. Melhor ainda é saber que, depois da experiência profissional, a vida me deu de presente um grande amigo.

À todos

*"Tu te tornas eternamente responsável*

*por aquilo que cativas"*

(Antoine de Saint-Exupéry)

*“Nasceste no lar que precisavas,*

*Vestiste o corpo físico que merecias,*

*Moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu adiantamento,*

*Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades, nem mais,*

*nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas,*

*Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização,*

*Teus parentes e amigos são as almas que atraíste com tua própria afinidade*

*Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle,*

*Tu escolhes, recolhes, eleges, atrais, buscas, expulsas,*

*modificas tudo aquilo que te rodeia a existência,*

*Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos e atitudes,*

*São as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivência,*

*Não reclames nem te faças de vítima, antes de tudo, analisa e observa,*

*A mudança está em tuas mãos,*

*Reprograma tua meta, busca o bem e viverás melhor,*

***Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,***

***Qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”***

Chico Xavier

# Sumário


Introdução 13

Revisão da Literatura 15

Bloqueadores da Calcineurina 15

Indicação terapêutica 16

Mecanismo de ação 17

Vias de administração e apresentação 18

Absorção e concentração sérica 19

Metabolização e excreção 20

Efeitos secundários 21

Nefrotoxicidade 22

Diabetes mellitus 23

Influência sobre o osso 24

Proposição 31

Artigo 1 – Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos 32

Artigo 2 - The influence of CsA and FK506 based immunosuppression on alveolar bone: a histometric, stereometric and ultrastructural study 58

Conclusão 92

Referências 93

Resumo 111

Abstract 113

Anexos 115

# INTRODUÇÃO

Os avanços na compreensão dos eventos que controlam o sistema imune, aliados à terapia imunossupressora e ao aprimoramento de técnicas cirúrgicas, propiciam, de forma incontestável, avanços significativos no sucesso da inibição de rejeição dos transplantes.

Atualmente, a Ciclosporina-A (CsA) e o Tacrolimus (FK506), são drogas amplamente utilizadas nos protocolos terapêuticos imunossupressores (GARCIA et al., 2004; TAYLOR et al., 2005; ZHAO et al., 2005). Paralelamente, também são utilizadas no tratamento de doenças auto-imunes, como artrite reumatóide, psoríase e líquen plano (KOVARIK et al., 2003; SANCHEZ et al ., 2004) assim como no tratamento dos retinoblastomas (ECKSTEIN et al, 2005). Ambas as drogas atuam na via de sinalização de cálcio, inibindo a calcineurina e o fator nuclear de células T ativadas (NFATc), primeiro sinal para ativação dos linfócitos T helper e linfócito T citotóxico (FOXWELL et al., 1990; PLOSKER e FOSTER, 2000), bem como a síntese de interleucina-2 (IL-2), receptor de IL-2, interferon gama (INF-γ) e fator de necrose tumoral-∀ (TNF-∀) (BADER et al.,1998; OETTINGER-BARAK et al., 2001).

A CsA induz efeitos secundários como nefrotoxicidade, hipertensão arterial, síndrome urêmica hemolítica, hipercolesterolemia, hipertricose, aumento gengival, hirsutismo e diabetes (GARCIA et al., 2004; TAYLOR et al., 2005), muitas vezes inviabilizando seu uso.

A utilização do FK506 é uma alternativa escolhida para compor o protocolo da imunossupressão em substituição a CsA. Possui atividade imunossupressora entre 10 a 100 vezes maior que a CsA (SCOTT et al., 2003). Entretanto, o FK506 também induz alguns efeitos secundários, incluindo nefrotoxicidade, neurotoxicidade e diabetes (JAMES et al., 2000; PLOSKER e FOSTER, 2000).

Há relatos na literatura em que a CsA induz perda óssea, caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas (EPSTEIN, 1996;

HOFBAUER e HEUFELDER, 2000; FU et al., 2001; SHEN et al., 2001; SPOLIDORIO, 2003). Por outro lado, a ação do FK506 no tecido ósseo é incerta e conflitante. Alguns trabalhos “in vivo” e “in vitro” sugerem que o FK506 induz perda óssea (CVETKOVIC et al., 1994; ROMERO et al., 1995; CAYCO et al., 2000; STEMPFLE et al., 2002), enquanto outros sugerem aumento do metabolismo ósseo, sem prejuízo da densidade óssea (FIORE et al., 2000; INOUE et al., 2000; GOODMAN et al., 2001; GOFFIN et al., 2002; GOFFIN et al., 2003; SCOLAPIO et al., 2003; SEGAL et al., 2003; GUICHELAAR et al., 2004). Neste caso, parece haver uma tendência de que o tecido ósseo, sob a ação do FK506, conserve sua integridade estrutural e bioquímica (GHICHELAAR et al., 2004), mesmo aumentando seu metabolismo.

O sistema esquelético e o sistema imune estão intimamente relacionados pois compartilham moléculas regulatórias como citocinas, receptores, moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição. Além disso, as células imunes, formadas na medula óssea, interagem com as células ósseas (TAKAYANAGI, 2005a). É de se esperar, então que, a alteração em um dos sistemas, conseqüentemente leve à alteração do outro.

A homeostase óssea está na dependência da ação equilibrada das células do tecido ósseo: osteoblastos e osteoclastos. Os osteoblastos são células mononucleadas, de origem mesenquimal, envolvidas no processo de mineralização óssea e os osteoclastos, células multinucleadas, possivelmente formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem de origem hematopoiética, são as células responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo (RHO et al., 2004).

Atualmente, há evidências que sugerem que as células T desempenhem um papel crucial no desenvolvimento e função dos osteoclastos, através da sinalização entre Interferon (INF) e RANKL (RHO et al., 2004). Porém, ainda é absolutamente necessário mais estudos a fim de elucidar esta estreita relação, assim como abordar aspectos morfológicos das eventuais alterações ósseas induzidas por drogas imunossupressoras, como a CsA e o FK506.

# PROPOSIÇÃO

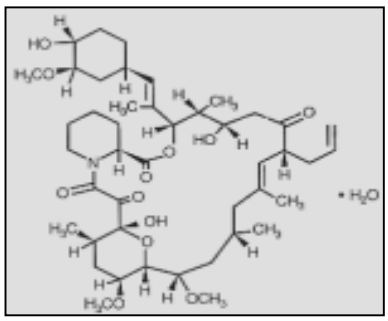
O objetivo deste trabalho foi analisar os padrões morfológicos do tecido ósseo da região de furca dos primeiros molares superiores dos ratos tratados com CsA ou FK506.

# REVISÃO DA LITERATURA

## BLOQUEADORES DA CALCINEURINA

A CsA e o FK506 são agentes imunossupressores que inibem a calcineurina (fosfatase cálcio dependente) e são considerados a base para a composição do protocolo imunossupressor pós-transplantes (ARMSTRONG et al., 2001; GARCIA et al, 2004).

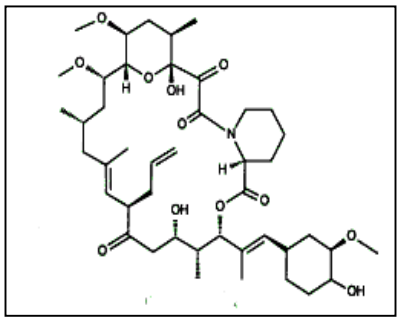
Estrutura química da CsA



**CsA**

A CsA foi inicialmente descrita na década de 70 e a partir da década de 80 auxiliou na terapia de imunossupressão, imprescindível no transplante de órgãos (GARCIA et al., 2004). É um polipeptídeo fúngico cíclico hidrofóbico e lipofílico, cuja fórmula é $C_{62}H_{111}O_{12}$ e cujo peso molecular é 1202.6kDa. Inicialmente foi usada como agente antifúngico, pois foi isolada de duas espécies de fungos : *Trichoderma polysporum rifai* e *Cylindrocarpo lucidum* (CALNE et al., 1979; DALEY e WYSOCKI, 1984). Foi produzida comercialmente a partir da cultura do fungo *Tolypocladium inflatum gams* (GOODMAN et al., 2001).

Estrutura química do FK506



**FK506**

O FK506 foi descrito em 1987 como opção terapêutica na profilaxia e tratamento de rejeição de órgãos. É um antibiótico macrolídeo fúngico, extraído da fermentação do microrganismo S*treptomyces tsukubaensis,* possuindo ação imunossupressora mais potente que a CsA (OETTINGER-BARAK et al., 2001; GARCIA et al., 2004). É a droga base usada em mais de 80% dos transplantes hepáticos e 30% dos transplantes renais e pode ser uma alternativa de protocolo imunossupressor em substituição à CsA (SCOTT et al., 2003).

## Indicação terapêutica

Ambas as drogas são largamente utilizadas na profilaxia e tratamento de rejeição de órgãos transplantados, como coração, pulmão, rins, medula óssea e fígado (CALNE et al., 1979; PLOSKER e FOSTER, 2000; MOSER, 2002).

A CsA também têm sido utilizada para o tratamento de diabetes tipo II, artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla e malária (KOVARIK et al., 2003) e apresenta eficácia clínica no tratamento de retinoblastomas (ECKSTEIN et al., 2005).

Nos transplantes de medula, quando ocorre complicações como na doença do hospedeiro versus enxerto (GVHD), pode haver o aparecimento de lesões de líquen plano oral, como primeira manifestação de GVHD crônica. O FK506 têm sido utilizado para o tratamento deste tipo de lesão, com bastante sucesso e remissão dos sintomas em cerca de dois meses, em uma formulação tópica (0,1%), três vezes ao dia (SANCHEZ et al., 2004).

**Mecanismo de ação**

O FK506 e CsA são potentes agentes inibidores da calcineurina (fosfatase ativada por cálcio), sendo que esta inibição é alcançada através de complexos que são formados com diferentes proteínas de ligação (SCOTT et al., 2003).

A **CsA,** com base no sítio de ação imunorregulatório, é classificada como um inibidor da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T (FOXWELL et al., 1990). Não é uma droga citotóxica e exerce seu efeito em uma população restrita de células linfóides, o que lhe confere seletividade (YAMADA et al., 1992). A ação supressora depende da formação de um complexo com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina (uma proteína intracelular de ligação da família da calmodulina), sendo que este complexo inibe a atividade da calcineurina, o que resulta na inibição da expressão de genes de proteínas nucleares (fator nuclear de células T ativadas – NFATc) envolvidas na ativação celular e ativação do linfócito T citotóxico (GARCIA et al., 2004). O NFATc desloca-se para o núcleo, ligando-se à região promotora de genes IL-2, IL-3, IL-4, INF-γ, causando a transcrição e secreção das citocinas. O bloqueio do NFATc é considerado o principal efeito da CsA (FRUMAN et al., 1992; GARCIA et al., 2004; TAYLOR et al., 2005).

O **FK506** é um imunossupressor macrolídeo que inibe a resposta imune celular, através de vários mecanismos de ação, envolvendo a inibição da calcineurina. A inativação da calcineurina, através da formação do complexo com a FKBP12 (proteína 12 acoplada ao FK506), age de maneira similar ao complexo ciclosporina-imunofilina e interrompe a translocação do fator de transcrição das células T ativadas, mediadas por IL-2 (STEMPFLE et al., 2002; TAYLOR et.al., 2005), que promovem a proliferação das céls. T helper. O FK506 atua sobre a sinalização para a produção de IL-2, neste caso, as células T (memória) ficam suprimidas, porém suas atividades são mantidas contra o enxerto (SOTT et al., 2003). Inibe também a imunidade humoral, embora em menor extensão do que a imunidade celular (PLOSKER e FOSTER, 2000).

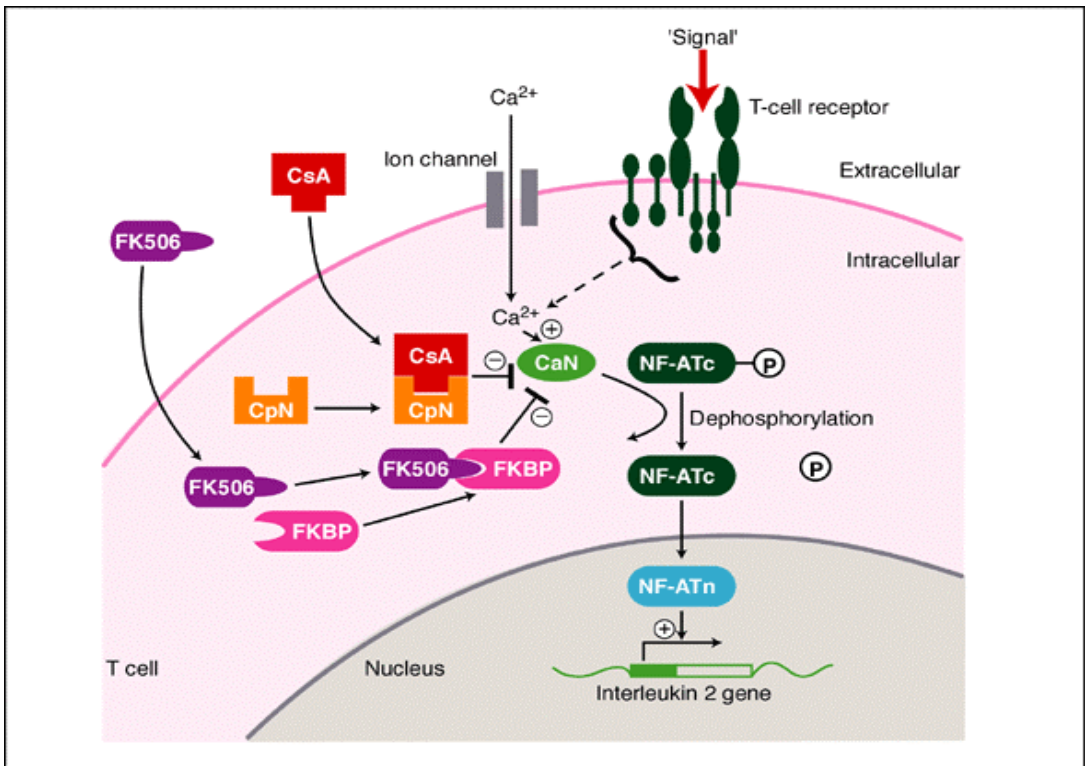



FIGURA 1 – MECANISMO DE AÇÃO DA CsA E FK506
NFATC: FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS.
FKBP: PROTEÍNA LIGANTE DO FK506.
STEPKPWSKI, S.M. Disponível em: http://www- ermm.cbcu.cam.ac.uk/00001782h.htm. Acesso em: 4 abr. 2005).

## Vias de administração e apresentação

## CsA

A forma de administração mais usada em humanos é a via oral, mas também pode ser administrada via intramuscular ou intravenosa. Comercialmente está disponível sob a forma líquida,100 mg/mL ou comprimidos de 25mg, 50mg ou 100 mg.

Em ratos, o nível adequado de imunossupressão com mínimos efeitos secundários é obtido, administrando-se 10mg/Kg de peso/dia pela via

subcutânea (WASSEF et al., 1985), apresentado níveis séricos semelhantes para ratos machos e fêmeas (STILLER et al., 1993).

A via de administração subcutânea, em ratos, é mais vantajosa, já que não requer anestesia, é melhor tolerada pelo animal e permite que a droga atinja níveis plasmáticos adequados e uniformes (WASSEF et al., 1985).

**FK506**

O FK506 encontra-se disponível em comprimidos de 1 e 5mg ou na forma líquida, em ampolas, de 5mg/mL. Em humanos, preferencialmente, deve ser tomado via oral, mas se isso não for possível, a terapia pode ser iniciada por infusão intravenosa contínua, mas devido ao risco de reação anafilática, a via de administração oral deve ser eleita assim que as condições clínicas permitirem, ou seja, em torno de 2-3 dias (SCOTT et al., 2003). Tanto em humanos quanto em ratos, a dose recomendada é de 1mg/Kg de peso/dia (JIANG et al., 1995).

**Absorção e concentração sérica**

**CsA**

A absorção da CsA ocorre de maneira incompleta após a administração via oral, pelo trato gastrointestinal (GUERCKI et al., 1985). O pico de concentração sérica ocorre entre 2 a 6 hs após a administração oral. A dose de CsA de 10 a 20 mg/Kg de peso/dia proporciona níveis séricos que variam entre 100 e 400ng/mL respectivamente e é efetiva na supressão da resposta imune, minimizando seus efeitos tóxicos (KEOWN et al., 1992; BOLTCHI et al., 1999).

**FK506**

A absorção do FK506 é rápida, porém incompleta no trato gastrointestinal. É largamente distribuído na maioria dos tecidos e atravessa a placenta com concentração no plasma do cordão umbilical de aproximadamente um terço da concentração do plasma materno e os níveis no leite materno são similares aos observados no plasma. Não foi encontrado no fluido cerebroespinhal, mesmo em pacientes com neurotoxicidade relacionada à droga (SCOTT et al. 2003). A baixa absorção do FK506, aliada a baixas concentrações no plasma e sangue e ainda a presença de metabólitos e outras drogas que interferem na sua concentração, fazem com que haja dificuldade no desenvolvimento de uma técnica simples, específica e sensível para medir sua concentração sanguínea (VENKATARAMANAN et al., 1995). O pico de concentração sérica ocorre em aproximadamente 1-2 horas após a administração oral.

**Metabolização e excreção**

**CsA**

Sua metabolização acontece no fígado, principalmente através do citocromo P450 (ZHAO et al., 2005), com metabolismo semelhante em humanos, cães, coelhos e ratos (MAURER et al., 1985). O fígado é o órgão responsável pela excreção de 90% da CsA através da bile para as fezes, sendo que os 10% restantes são excretados através da urina (DUNN, 2003).

**FK506**

É extensivamente metabolizado no fígado e em menor extensão pela mucosa intestinal, principalmente pelo citocromo P450 (ZHAO et al., 2005). É excretado como menos de 1% de droga inalterada pela urina (SCOTT et al., 2003). Dados em animais mostram ser a excreção biliar a maior rota para eliminação de metabólitos, com eliminação fecal em torno de 90% da dose administrada.

**Efeitos secundários**

O monitoramento terapêutico das concentrações dos agentes imunossupressores no sangue tem demonstrado ser de grande valor para otimizar o tratamento imunossupressor e minimizar a toxicidade relacionada às drogas (SCOTT et al., 2003).

Os principais efeitos secundários resultantes da administração de CsA são: sudorese, formigamentos de mãos, pés e boca, tremores de mãos e pés, hipertricose, principalmente face, braços e pernas, aumento gengival, às vezes associado a dor, inchaço e eritema, corrimento nasal, alto risco de infecção, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, hipertensão arterial, fibrose dos tecidos pulmonar, pericardial, renal e aumento do metabolismo ósseo (BOLTCHI et al.,1999; TAYLOR et al., 2005). A maioria desses sintomas também pode ser atribuída ao uso contínuo do FK506, entretanto, a incidência de alguns tipos de neurotoxicidade, distúrbios no metabolismo da glicose, diarréia, pruridos e alopécia pode ser maior no tratamento com FK506 (GARCIA et al., 2004). Há pouquíssimos relatos de aumento gengival associado a essa droga. O FK506 tem ações não imunes, que produzem efeitos como a hipertricose, regeneração das células do fígado, melhora na função após lesão do nervo ciático, melhora nos padrões de regeneração axonial nos neurônios sensoriais e propriedades neuroprotetoras e neuroregenerativas (VOGGENREITTER et al., 2000).

**- Nefrotoxicidade**

**CsA**

O maior efeito adverso da CsA parece ser a nefrotoxicidade, que pode ocorrer em cerca de 75% dos pacientes (OETTINGER-BARAK et al., 2001), pois altera a hemodinâmica glomerular e apresenta alterações microscópicas caracterizadas pela presença da vacuolização tubular, fibrose interstical e hialinose arteriolar (GARCIA et al., 2004).

**FK506**

Pacientes pediátricos transplantados renais, tratados com FK506 como terapia base, apresentaram função renal aceitável (CHAKRABARTI et al., 2000). O FK506 induz a expressão de baixas quantidades de TGF-∃, fator de crescimento associado à patogênese da nefropatia crônica do enxerto (MATL et al., 2005).

**Substituição da CsA para FK506**

A conversão terapêutica da CsA para o FK506 parece ser uma alternativa viável para os pacientes transplantados que desenvolveram algum tipo de toxicidade (HOHAGE et al., 2005). Esta conversão oferece efetiva compensação da toxicidade, ilustrado pela normalidade dos marcadores bioquímicos circulantes que acusam tais toxicidades. Relatam-se também, que outros efeitos secundários indesejáveis como hiperlipidemia, hirsutismo, aumento gengival e neurotoxicidade tenham resolução completa ou parcial com a conversão terapêutica da CsA para o FK506 (BURROWS et al., 1998).

**- Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus pós-transplante é uma alteração metabólica comum em pacientes tratados com FK506 (OBERHOLZER et al., 2005; VICENTI et al., 2005).

Recentemente em nosso laboratório, observamos, em ratos, que o FK506 na dose de 1mg/Kg de peso corporal/dia induziu estado de diabetes. Verificou-se ainda que, as alterações glicêmicas dependem do tempo de tratamento. Em períodos curtos (60 e 120 dias), observou-se elevados níveis glicêmicos e em períodos longos (240 dias), houve normalização da glicemia (NASSAR et al., 2006). Em alguns casos, sugere-se que haja mudança no protocolo terapêutico dos pacientes que apresentem diabetes pós-transplante. Uma alternativa é a conversão do FK506 para a CsA.

**Substituição do FK506 para CsA**

A conversão do FK506 para a CsA é uma alternativa que está sendo estudada. O primeiro trabalho que observou as conseqüências desta conversão como rotina na prática clínica em pacientes transplantados estáveis, foi realizado em 2000 e nele não houve mudança nos níveis glicêmicos (HIGGINS et al., 2000). Em outro acompanhamento de pacientes que receberam esta conversão, houve uma reversão no quadro de diabetes em 44% no primeiro ano. Os autores concluíram que a conversão pôde ser associada a uma melhora notável no metabolismo da glicose e uma reversão freqüente do estado diabético (BOUCHTA et al., 2005). Em outro estudo verificou-se que não houve episódios de rejeição nem piora da função renal após a conversão e a partir disto, sugeriram que a conversão para a CsA parece ser uma maneira simples, segura e eficaz na reversão ou pelo menos uma melhora na diabetes pós-transplante (OBERHOLZER et al., 2005).

**- Influência da CsA e do FK506 sobre o osso**

Observações clínicas assim como em trabalhos experimentais mostram que tanto a CsA quanto o FK506 parecem estar relacionados a um *turnover* ósseo aumentado (EKELUND & NILSSON, 1996; KAWANA et al., 1996; CUETO-MANZANO et al., 1999; FU et al., 1999; FIORE et al., 2000; GOODMAN et al., 2001; GOFFIN et al., 2003; SCOLAPIO et al., 2003; SEGAL et al., 2003; SPOLIDORIO, 2003; GUICHELAAR et al., 2004), através de mecanismos ainda não totalmente compreendidos e esclarecidos.

A perda óssea pós transplante têm sido relatada em pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos (EPSTEIN et al., 1996; EPSTEIN e SHANE et al., 1996; SHANE et al., 1997), o que pode resultar em fraturas. Não está claro qual a contribuição das drogas imunossupressoras para a ocorrência da perda óssea, nem como acontece a alteração do turnover ósseo após os transplantes seguidos de protocolos terapêuticos imunossupressores.

Trabalhos "in vivo" e "in vitro" mostram osteopenia ou osteoporose causada pela CsA em animais e em humanos. Foram encontradas observações histológicas de aumento da remodelação óssea, com reabsorção excedendo a formação de osso e maiores concentrações de marcadores ósseos, como a fosfatase alcalina (aumento da atividade osteoblástica) e osteocalcina (proteína envolvida na mineralização) (MOVSOWITZ et al., 1988; SCHLOSBERG et al., 1989; DERFUS et al., 1991).

**Influência da CsA sobre o osso**

**- Estudos "in vitro"**

Estudos "in vitro" são contraditórios. Alguns mostram que a CsA pode inibir a reabsorção óssea, através do aumento de osteoblastia e diminuição da osteoclasia (STEWART et al.,1986; KLAUSHOFER et al., 1987; SASAGAWA et al., 1989; STEWART e STERN, 1989), enquanto outros

mostram inibição da proliferação osteoblástica, assim como diminuição dos níveis de fosfatase alcalina (McCAULEY et al., 1992).

**- Estudos em ratos**

Alguns estudos em ratos também são inconclusivos e os autores sugerem que a ação da CsA possa estar relacionada à dose, idade, gênero e tempo de administração.

*Dose*

Alguns trabalhos relatam que o desequilíbrio homeostático dos ossos, resultando em osteopenia, pode ser em decorrência da dosagem de imunossupressor utilizada (EPSTEIN et al., 1990; ERBEN et al., 1998). Ratos tratados com altas doses de CsA (30mg/Kg de peso corporal/dia) apresentam reabsorção óssea nos sítios periodontais e diminuição da formação óssea nos sítios sinfiseais (FU et al., 1999). Recentemente, Spolidorio et al. (2003), relataram perda óssea alveolar em ratos tratados com 10mg/Kg de peso corporal/dia.

*Idade*

A sugestão de perda óssea induzida pela CsA também pode, em parte, estar associada à idade (MOVSOWITZ et al., 1988; SCHOLBERG et al., 1989; EPSTEIN et al., 1990). Por outro lado, trabalhos em ratos concluíram que a diminuição do volume ósseo alveolar não é idade dependente (SPOLIDORIO et al., 2004).

*Gênero*

Pode estar associada também ao gênero, pois os trabalhos que relatam perda óssea associada à administração de CsA, são trabalhos que

envolveram ratos e não ratas (MOVSOWITZ et al., 1988; ESPSTEIN et al., 1990; ERBEN et al., 1998).

*Tempo de tratamento*

Ratos tratados com CsA apresentaram perda óssea proporcional ao aumento da densidade volumétrica dos osteoclastos, sendo que ambos foram dependentes do tempo de tratamento. A relação perda óssea/tempo de administração parece existir, pois com a interrupção do tratamento, houve diminuição progressiva da perda óssea (SPOLIDORIO, 2003). Mas no estudo de Schlosberg et al., (1989), mesmo com a interrupção do tratamento com a CsA, pareceu não haver uma restauração completa do volume ósseo.

Todos estes fatores ainda merecem ser estudados, por serem pouco explorados na literatura pertinente.

A avaliação dos efeitos da CsA sobre o côndilo de ratos, mostrou diminuição da espessura do trabeculado ósseo, assim como largura de tecido osteóide, volume osteóide e espessura da cortical óssea (FU et al., 2001). O mesmo padrão de diminuição de volume e largura de tecido osteóide foi observado em alvéolo dental de ratos tratados com CsA (SHEN et al., 2001).

Os mesmos resultados foram obtidos por Kawana et al., (1996), pois através do aumento da piridinolina urinária (Pyr), puderam verificar reabsorção óssea em relação à aposição. A formação óssea foi avaliada pela osteocalcina sérica e volume osteóide. Concluiu-se, portanto, que a CsA induz perda óssea devido a uma dissociação entre reabsorção e formação óssea.

A administração exógena de TGF- ß pode modificar os efeitos deletérios da CsA sobre o tecido ósseo de ratos, segundo Goodman et al., (2001), assim como a terapia combinada com 1,25 $(OH)_2D3$ foi capaz de restaurar o volume ósseo (EPSTEIN et al., 1990).

**- Estudos em humanos**

A perda óssea em pacientes transplantados ocorre com maior intensidade no primeiro ano pós-transplante, ocorrendo uma estabilização após este período (GROTZ et al.,1995; EZAITOUNI et al., 1998; CUETO-MANZANO et al., 1999).

O uso de outros medicamentos, como os esteróides combinados à CsA, deixa dúvidas quanto à sua ação nas alterações ósseas pós-transplantes. A associação de drogas, como por exemplo, a CsA e os esteróides, se faz necessária, devido aos altos índices de rejeição aguda e conseqüente aumento na taxa de perda de enxertos (KRAMER et al., 2005). Por outro lado, a associação da CsA com o flurbiprofeno (bloqueador da Cox-1) não previne a perda óssea trabecular induzida pela terapia com a CsA, sendo que e a administração concomitante de ambas as drogas provoca efeitos renais adversos (SASS et al., 1996).

O monitoramento do metabolismo ósseo após transplante de medula óssea, seguido de terapia imunossupressora com CsA, indicou um turnover ósseo acelerado após o referido transplante, devido à estimulação dos osteoblastos pela CsA (WITHOLD et al., 1996) e em pacientes transplantados cardíacos, houve uma perda óssea contínua na coluna vertebral, provavelmente associada ao alto turnover ósseo, eventualmente induzido pela CsA (THIEBAUD et al., 1996).

O volume ósseo de transplantados renais do gênero masculino, em um estudo por longo período de tempo, foi significantemente mais baixo quando comparado a pacientes do gênero feminino. Os autores concluíram que houve diminuição da densidade mineral óssea tanto no osso trabecular quanto no cortical. Esta diminuição não foi tão severa quanto nos relatos de acompanhamento de curto prazo. Observaram, ainda, uma estimulação osteoclástica, supressão osteoblástica e retardo na aposição mineral e taxa de formação óssea (CUETO-MANZANO et al., 1999).

**Influência do FK506 sobre o osso**

**- Estudos em humanos:**

O fator de diferenciação osteoclástica (ODF) e o fator de inibição da osteoclastogênese (OCIF) ajudam a elucidar o mecanismo de maturação e diferenciação osteoclástica. A expressão destes dois fatores foi encontrada em pacientes com osteoporose pós-transplante, tratados com FK506, sugerindo que o agente imunossupressor age nos osteoclastos promovendo a expressão de mRNA para ODF, provocando uma diferenciação e maturação dos osteoclastos (FUKUNAGA et al., 2004).

Em transplantados renais tratados com FK506, associado à baixas doses de predinisona, concluiu-se que esta associação pode evitar a perda óssea, comum no período pós transplante renal (GOFFIN et al., 2003). Esta mesma associação, administrada por 4 meses, em pacientes hepáticos, não foi associada à perda óssea nos períodos avaliados (SCOLAPIO et al., 2003).

Os efeitos do FK506 sobre a densidade mineral óssea também foram investigados em pacientes transplantados cardíacos. Verificou-se rápida perda óssea inicial após altas doses de FK506 (STEMPFLE et al., 2002). Nesse caso, a dosagem pode ter colaborado com os achados.

**Estudos comparativos entre CsA e FK506**

**- em ratos**

Como citado anteriormente, o FK506 tem sido utilizado na intenção de contrapor-se aos efeitos tóxicos da CsA, sem perda da eficácia clínica. A ação, tanto da CsA quanto do FK506 sobre o metabolismo ósseo mineral têm sido avaliada. Cvetkovic et al., (1994) verificaram expressivo aumento das medidas de formação e reabsorção óssea, acompanhado de uma redução

significante em porcentagem da área trabecular, em ratos tratados com FK506, quando comparados aos ratos tratados com a CsA

Estudo recentes discordam desses resultados. Verificaram que o FK506 parece não induzir perda óssea severa pelo alto turnover do metabolismo ósseo e que talvez possa exercer efeitos favoráveis no metabolismo ósseo em pacientes transplantados, quando comparado à CsA (INOUE et al., 2000).

Por outro lado, Abdelhadi et al., (2002) sugerem que ambas as drogas promovem efeitos adversos no osso e quando em doses elevadas, resultam na alteração do tecido ósseo, tanto cortical quanto trabecular, com conseqüente osteopenia.

**- em humanos**

Avaliações clínicas sugerem que o FK506 parece agir mais favoravelmente sobre o metabolismo ósseo em pacientes que receberam transplante de fígado, em comparação com a CsA (MONEGAL et al., 2001; SEGAL et al, 2003; GUICHELAAR et al., 2004; SMALLWOOD et al., 2005). A mesma conclusão pôde ser admitida para pacientes que receberam transplante de rim (GOFFIN et al., 2002).

Como citado anteriormente, já é bem estabelecida na literatura a existência de uma condição osteoporótica imediata após os transplantes renais, caracterizada por uma rápida diminuição da densidade da coluna lombar e fêmur, que leva à ocorrência de fraturas ósseas (TORRES et al., 2003). Esta condição está relacionada à pacientes tratados com CsA e altas doses de esteróides, principalmente no primeiro ano pós-transplante (MARCEN et al., 2005). Pacientes transplantados renais, tratados com FK506 e baixas doses de predinisona pareceu evitar a usual perda óssea pós transplante renal (GOFFIN et al., 2003). Em outro estudo, a retirada dos esteróides demonstrou que a terapia imunossupressora com FK506 pode ser considerada uma opção de escolha em transplantados renais (KRAMER et al., 2005).

Os efeitos da conversão da CsA para o FK506 ainda não têm sido bem avaliados em pacientes transplantados hepáticos. A administração concomitante de glicocorticóides ou estrógenos interfere na investigação do papel do FK506 e da CsA separadamente na alteração da densidade mineral óssea. Embora a CsA seja uma possibilidade clínica para os transplantados hepáticos, os efeitos secundários e o desenvolvimento de rejeição têm limitado seu uso, fazendo da conversão para o FK506 uma opção necessária. A conversão parece ser segura e eficaz com relação à manutenção ou até mesmo ao aumento da densidade mineral óssea em pacientes do sexo masculino (OTT et al., 2003), sendo ainda, um modelo apropriado nos casos de necessidade de resgate do enxerto e tratamento de uma variedade de efeitos colaterais após o transplante de fígado. (SELZNER et al. 2001).

# Artigo 1

# Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos.

# Bone tissue: morphologics and histophysiologics aspects.

*Denise Carleto Andia - aluna de Mestrado em Periodontia (Andia DC)* [a]

*Paulo Sérgio Cerri - Professor (Cerri PS)* [b]

*Luis Carlos Spolidorio – Professor (Spolidorio LC)* [c]

[a] Departamento de Periodontia,

[b] Departamento de Morfologia,

[c] Departamento de Fisiologia e Patologia,

Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Brasil.

**Autor correspondente: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**

**e-mail: pcerri@foar.unesp.br**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP - Rua Humaitá, nº 1680

Caixa postal 331, Araraquara, SP – Brasil- CEP: 14801–903

Departamento de Morfologia

Telefone: (16) 33016497 Fax: (16) 33016433

*** Artigo submetido à Revista de Odontologia da UNESP.**

**Resumo**

O tecido ósseo tem papel importante no suporte, proteção e locomoção e está sob o controle de *fatores sistêmicos*, como os hormônios e *fatores locais*, como os fatores de crescimento e citocinas. Portanto, os sistemas imune e esquelético encontram-se intimamente relacionados; a esta área interdisciplinar de estudos deu-se o nome de Osteoimunologia . A homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea e osteoclastos, células de reabsorção óssea. Este balanço é firmemente controlado pelo sistema imune. Se este balanço inclinar-se a favor dos osteoclastos, levará a reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides e doenças osteoporóticas. A compreensão deste processo, como um todo, pode ser a chave para o desenvolvimento de um protocolo de tratamento que poderia levar ao equilíbrio dessas doenças ósseas. Sendo assim, nesta revisão da literatura, nós fornecemos uma visão do tecido ósseo: a composição química de sua matriz, células e componentes celulares, descrevendo como ocorre o processo de remodelação óssea e alguns fatores locais e sistêmicos que interferem neste processo, como citocinas e hormônios.

**Palavras-chave**

Osteoblastos, osteoclastos, tecido ósseo e sistema imune.

**Abstract**

The bone tissue has an important role in the support, protection and locomotion and it is under control of systemic factors, such as hormones and local regulatory molecules, for instance, growth factor and cytokines. Therefore, the immune and skeletal systems are intimately related; this interdisciplinary branch has been referred to as Osteoimmunology. The homeostasis of the skeletal system depends directly on a balanced bone remodeling, i.e., the dynamic balance between the activities of the osteoblasts, bone forming cells and osteoclasts, bone resorbing cells. This balance is tightly and thoroughly controlled by some regulatory systems, such as the immune system. Tipping this balance towards the osteoclasts leads to pathological bone resorption, such as periodontitis, autoimmune arthritis and osteoporotic diseases. The understanding this overall process may be the key to development of a treatment protocol, which could lead to the balance of these bone diseases. Thus, in this literature review, we provide an overview of the bone tissue composition, its cells and proteins of bone matrix, describing how the remodeling bone process occurs, as well as some local and systemic factors that interfere in this process, such cytokines and hormones.

**Keywords**

Osteoblasts, osteoclasts, bone tissue and immune system.

## INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem algumas funções básicas como suporte, proteção e locomoção e está sob o controle de *fatores sistêmicos*, como os hormônios e *fatores locais,* como os fatores de crescimento e citocinas[1]. Portanto, os sistemas imune e esquelético encontram-se intimamente relacionados; a esta área interdisciplinar de estudos deu-se o nome de Osteoimunologia[2] .

A homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea e osteoclastos, células de reabsorção óssea. Este balanço é firmemente controlado por alguns sistemas regulatórios, como o sistema imune. Se este balanço inclinar-se a favor dos osteoclastos, ocorrerá reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides e doenças osteoporóticas[2].

Sendo assim, nesta revisão da literatura, nós fornecemos uma visão do tecido ósseo: a composição química de sua matriz, células e componentes celulares, descrevendo como ocorre o processo de remodelação óssea e alguns fatores locais e sistêmicos que interferem neste processo, como citocinas e hormônios.

# TECIDO ÓSSEO

## Aspectos macroscópicos

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode se apresentar como *compacto*, na região mais periférica dos ossos, denominada cortical e *esponjoso* ou *trabecular*, com rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes, que abrigam a medula óssea. As superfícies ósseas internas e externas são revestidas respectivamente pelo endósteo e periósteo. O periósteo constitui membrana de grande importância para a integridade dos ossos[1,3] .

## Aspectos microscópicos

O tecido ósseo pode ser classificado em *primário* (imaturo) que se apresenta com disposição irregular, não organizada das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita. Está presente no feto, no calo ósseo, nas osteomielites, nos tumores ósseos e na doença óssea de Paget. É classificado também como *secundário* (maduro, haversiano ou lamelar), com fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos canais de Harvers, formando osso compacto ou esponjoso[4].

Geralmente, sobre a superfície do tecido ósseo, deposita-se uma camada de matriz denominada osteóide, que se caracteriza por uma matriz não mineralizada, contendo grande quantidade de fibras colágenas tipo I produzidas pelos osteoblastos. Assim, ao microscópio de luz, o osteóide apresenta aspecto

amorfo e eosinofílico; além de ser encontrado em situações fisiológicas, também é encontrado nos tumores formadores de tecido ósseo[1,4] .

O tecido ósseo tem dois componentes básicos: células e matriz orgânica, sobre a qual se depositam os componentes inorgânicos.

## CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO

Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, participam quatro tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção: osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos e outra à reabsorção: osteoclastos.

***Osteoblastos:*** são células mononucleadas, de origem mesenquimal, que se apresentam como células polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. São cubóides ou ligeiramente alongadas e formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada (osteóide). São as células responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso bem como pela sua mineralização[5-6]. Quando ativas, possuem um citoplasma rico em organelas de síntese e secreção, como retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi desenvolvidos, grânulos de secreção, mitocôndrias, vesículas de transporte, vesículas endossômicas, lisossoma, além das proteínas do citoesqueleto[1,7-8]. Sintetizam a matriz orgânica, constituída de várias proteínas colágenas e não colágenas, tais como o colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas, proteínas produzidas pelos osteoblastos e citocinas. Estes

componentes interagem entre si e organizam-se, fornecendo um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além de algumas destas moléculas atuarem diretamente na mineralização[7-11].

Osteoblastos e pré-osteoblastos exibem níveis elevados da enzima fosfatase alcalina na superfície de suas membranas citoplasmáticas, que, quando liberada, contribui para o início da mineralização e o progressivo crescimento dos cristais de hidroxiapatita[1,9-11]. No processo inicial de formação do tecido ósseo, os osteoblastos, após secretar a primeira camada de matriz orgânica, parecem assumir um importante papel na sua mineralização. A partir dos osteoblastos adjacentes à matriz orgânica óssea recentemente sintetizada, brotam pequenas vesículas de sua superfície. Estas vesículas desprendem-se dos osteoblastos e portanto, são observadas entre os constituintes orgânicos da matriz óssea. Assim, são estruturas arredondadas, que se originam da membrana plasmática dos osteoblastos, sendo denominadas de vesículas da matriz[11]. Estas vesículas, que permanecem na matriz extracelular totalmente dissociadas das células, contêm glicoproteínas e exibem forte marcação em sua membrana para a fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é uma família de enzimas que hidrolisam os íons fosfatos, fornecendo-os para o interior das vesículas. Ocorre, também, um aumento da concentração de íons cálcio no interior dessas vesículas, provavelmente através dos fosfolipídios em suas membranas. Sendo assim, ocorre uma supersaturação de fosfato e cálcio, resultando na precipitação de fosfato de cálcio no interior das vesículas. Posteriormente, ocorre o rompimento da membrana das vesículas e a mineralização espalha-se pela matriz. Este processo é

característico dos locais onde está ocorrendo pela primeira vez a formação e mineralização do tecido ósseo[11-13]. Deve-se ressaltar que as vesículas da matriz também são liberadas pelos condrócitos durante a mineralização da cartilagem[14], bem como pelos odontoblastos, durante a formação da primeira camada de dentina[15-16].

Os osteoblastos também funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação, pois possuem receptores para hormônios, como o da tireóide, da paratireóide (PTH), estrogênios, glicocorticóides, insulina, Vitamina D (1,25 Dihidroxivitamina D3). Secretam fatores de regulação como Interleucina-6 (IL-6) e fatores de crescimento como TGF-∃ que são fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica[1,7,17]. Além disso, os osteoblastos têm a capacidade de modificar a matriz adjacente, removendo ou alterando as proteoglicanas ou glicoproteínas. Iniciam, então a mineralização da matriz, através da secreção de vários reguladores como IL-6, TGF-∃ e Interferon-γ (INF-γ)[8].

Assim, os fatores sistêmicos e locais controlam a proliferação, atividade e sobrevivência dos osteoblastos. Alguns estudos mostram que os osteoblastos e/ou osteócitos podem sofrer apoptose, em conseqüência, por exemplo, a trauma mecânico[18] ou deficiência de estrogênio[19-20]. Em condições fisiológicas, a apoptose de osteoblastos parece exercer um importante papel no controle do crescimento ósseo[21]. A apoptose é um mecanismo de morte celular, sendo, portanto, responsável pelo equilíbrio populacional de células no tecido e órgãos. A apoptose, quando desencadeada, ativa uma complexa cascata

proteolítica intracelular que coordena todo o processo de morte celular. Como conseqüência da ativação das proteínas intracelulares promotoras da apoptose, a célula fragmenta-se originando os corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos expressam em sua membrana plasmática, entre outras moléculas, a fosfatidilserina que atraí os fagócitos e estes rapidamente internalizam os corpos apoptóticos. Recentemente, foi mostrado que os osteoblastos, além de participar na formação e mineralização da matriz óssea, podem também fagocitar os corpos apoptóticos oriundos de osteoblastos e/ou células de revestimento ósseo, durante o início da formação óssea[6].

***Células de revestimento ósseo (bone-lining cells)***: representam os osteoblastos que recobrem as superfícies ósseas quiescentes; assim, estas células exibem escassas organelas de síntese e secreção de proteínas e formam uma camada contínua de células interconectadas capaz de manter a homeostase, regulando a concentração plasmática de cálcio por mecanismos parcialmente independentes dos relacionados ao sistema de remodelação óssea[9], sendo consideradas como sítio primário de troca de íons entre o sangue e o osso do adulto. A transição do osteoblasto para "bone linning cells" envolve mudanças morfológicas e funcionais graduais que culminam com a diminuição da secreção de proteínas. Esta transformação pode representar o fenótipo final da linhagem osteoblástica[8]. No entanto, estas células que revestem a superfície óssea, sob determinados estímulos, podem diferenciar-se em osteoblastos e conseqüentemente produzir matriz óssea[11]. Assim, estas células de revestimento ósseo têm um importante

papel na manutenção/homeostase da matriz óssea e influência no metabolismo de cálcio e fosfato e troca de substâncias. Além disso, acredita-se que sejam responsáveis pela produção de moléculas que ativam a complexa cascata molecular que culmina na remodelação óssea[8,22].

***Osteócitos:*** são os osteoblastos que, à medida que secretam a matriz, ficam aprisionados no seu interior, em lacunas e mostram uma diminuição gradativa da quantidade de organelas de síntese e de secreção como RER e complexo de Golgi, caracterizando pobre atividade metabólica, porém indispensável para a manutenção da homeostase óssea[1,8]. Os osteócitos são o tipo celular mais abundante no tecido ósseo, em uma proporção de 10 osteócitos para cada osteoblasto[10]. São células elípticas, menores que os osteoblastos, que possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos, situados no interior de pequenos canais denominados canalículos ósseos. Estes prolongamentos citoplasmáticos se estendem em direção aos prolongamentos de outros osteócitos adjacentes, aos dos osteoblastos e células de revestimento ósseo do endósteo e periósteo, estabelecendo junções (tipo gap) entre estas células. Estas junções do tipo gap entre os prolongamentos dos osteócitos e entre os prolongamentos dos osteoblastos permitem que mesmo os osteócitos localizados nas porções mais profundas do osso possam responder às modificações sistêmicas, bem como às modificações na superfície óssea[7,11]. Dessa maneira, os canalículos ósseos constituem uma complexa rede que interconecta a superfície óssea às porções mais internas, rede esta que é a responsável pela manutenção e vitalidade da

matriz óssea[7,11]. Portanto, os osteócitos são considerados essenciais para a manutenção bem como para a remodelação óssea, desde que tem sido sugerido que a apoptose dos osteócitos pode atrair e estimular a atividade dos osteoclastos[23-24].

***Osteoclastos:*** são células gigantes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética[8,11]. Caracterizam-se, citoquimicamente, por apresentarem fosfatase ácida resistente ao tartarato, adenosina ácida trisfosfatada vanadato sensitiva, isosima anidrase carbônica II, entre outras enzimas[8,11]. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, promovendo escavações na superfície óssea denominadas lacunas de Howship. Adjacente à superfície óssea, sua membrana celular exibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova. Perifericamente a esta borda em escova, há uma região do citoplasma que se assemelha a uma faixa, diretamente apoiada na matriz óssea, denominada de zona clara. A zona clara, porção desprovida de organelas e rica em actina e miosina, está intimamente aderida à superfície óssea. Assim, ela parece ser responsável pela adesão do osteoclasto à superfície óssea, delimitando, desta forma, a borda em escova, compartimento onde ocorre a desmineralização bem como a degradação da matriz do tecido ósseo. Este compartimento cria um microambiente propício para a liberação e atividade das enzimas proteolíticas do osteoclasto, que, junto da geração de prótons pela enzima anidrase carbônica, promove um ambiente ácido, ocorrendo a desmineralização da matriz. A liberação de prótons é provavelmente necessária à

desmineralização do osso além de promover um ambiente ótimo para as enzimas lisossomais exercerem suas atividades enzimáticas[8,10-11]. As metaloproteinases da matriz, que podem ser ativadas em ambientes ácidos, também têm sido observadas nas lacunas de reabsorção e podem contribuir para a degradação da matriz óssea[11, 25].

O processo de reabsorção pode ser auto-regulável, devido à dissolução mineral que precede a degradação da matriz orgânica, o que significaria o desenvolvimento de uma matriz porosa adjacente à borda em escova do osteoclasto. Esta matriz porosa pode provocar o rompimento da adesão do osteoclasto, resultando em um descolamento deste[17]. Além disso, após a reabsorção, os osteoclastos podem migrar para outros sítios onde o tecido ósseo deve ser reabsorvido, bem como se deslocar da superfície óssea e permanecer como células inativas. Os osteoclastos inativos são células gigantes, multinucleadas, porém não apresentam borda em escova e zona clara, estruturas intimamente relacionadas à atividade reabsortiva dos osteoclastos[26]. Assim, o fator de crescimento tumoral (TGF-ß) e estrógeno parecem promover a apoptose, enquanto o paratormônio (PTH) e Interleucina-1 (IL-1) podem agir como supressores da apoptose, prolongando a atividade osteoclástica[8].

Apesar da função principal do osteoclasto ser promover a desmineralização e degradação da matriz óssea, evidencias têm reforçado a idéia que os osteoclastos são capazes de internalizar e digerir células e/ou restos celulares[27-28]. Assim, os osteoclastos podem internalizar osteócitos liberados durante a reabsorção óssea[24,27, 29]. Tem sido sugerido também que osteoblastos em

apoptose, possivelmente, podem estimular a migração de osteoclastos para determinados sítios que devem ser reabsorvidos[20,30-31]. Os osteoclastos atraídos para o local, imediatamente reconhecem e internalizam os osteoblastos e/ou osteócitos em apoptose[24,28-29].

## MATRIZ ÓSSEA

### As proteínas ósseas

O osso é constituído de uma parte orgânica e outra inorgânica. A matriz orgânica é formada de colágeno, principalmente tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas e a inorgânica por íons fosfato, cálcio e em menor quantidade, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A união do fosfato e do cálcio forma cristais com estrutura de hidroxiapatita que, associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo[3].

Algumas proteínas não colágenas, típicas dos tecidos mineralizados, como a osteocalcina e sialoproteína óssea e outras como a osteonectina/SPARC e osteopontina que têm uma distribuição mais generalizada, são liberadas do osso durante a sua desmineralização. Há, ainda, proteínas derivadas do sangue e fluidos teciduais que são concentradas no osso devido à sua afinidade pelos cristais minerais, como a albumina, ∀2HS-glicoproteína e imunoglobulinas[8].

Um importante grupo de glicoproteínas extraídas da matriz óssea desmineralizada, são as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), que pesam

cerca de 18kDa e são responsáveis pela indução óssea[32-33]. Classificadas como uma subfamília dentro da superfamília dos fatores de crescimento e transformação-∃ (TGF- ∃), podem ser encontradas, além do tecido ósseo, em vários outros tecidos, como cérebro, coração pulmão, rim, baço e fígado, apresentando papel importante, não só no desenvolvimento do esqueleto, mas também em outros processos fisiológicos, durante a embriogênese[33]. Pesquisas demonstram que, dentre as mais de 20 BMPs descobertas até o presente momento[34], há diferenças entre elas na capacidade de induzir a osteogênese. As BMPs 2, 6 e 9 parecem ter maior potencial na indução da diferenciação osteoblástica a partir das células mesenquimais progenitoras; a BMP-2, quando injetada localmente sobre a superfície da calvária de ratos, induz formação óssea periosteal, sem a formação prévia de cartilagem[34]. "In vivo", regulam alguns dos processos do desenvolvimento embrionário, incluindo cartilagem e formação óssea. No adulto, as BMPs regulam a proliferação e diferenciação, bem como a apoptose de vários tipos de células, tais como células mesenquimais, osteoblastos, condroblastos, células epiteliais e do tecido nervoso. O alvo final das BMPs é a alteração da expressão gênica no núcleo, mudando, assim, a atividade celular, incluindo o crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular[33].

## REMODELAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo, em diversos momentos, precisa modificar sua forma ou estrutura. Seja para um osso primário (primeiro tecido ósseo formado) tornar-se maduro, para um osso crescer mantendo sua forma, para um osso

esponjoso tornar-se compacto ou para se adaptar a novas situações fisiológicas ou patológicas, o osso está em constante remodelação, por meio de reabsorção e deposição de matriz óssea, que são processos estreitamente acoplados[1,3].

O desenvolvimento e a homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, firmemente controlada pelo sistema imune. Se este balanço inclinar-se a favor dos osteoclastos, levará a reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides, doenças osteoporóticas primárias ou secundárias e tumores ósseos[2].

O primeiro evento celular na seqüência de remodelação é a formação e ativação dos osteoclastos. Previamente à reabsorção da matriz mineralizada pelos osteoclastos, os osteoblastos/células de revestimento ósseo produzem colagenase, removendo a camada de osteóide, expondo a matriz mineralizada aos osteoclastos que se tornam ativos em contato direto com a matriz óssea mineralizada[12]. Outra possibilidade de modular a formação e atividade osteoclástica seria a partir de sinais gerados no microambiente, com a liberação de citocinas. As citocinas são moléculas de regulação, solúveis, de baixo peso molecular, expressas como proteínas de membrana ou secretadas, que se ligam a receptores específicos, em células alvo. Têm um papel vital tanto na regulação do tecido ósseo em condições fisiológicas quanto patológicas[8-9,35].

A formação do osso envolve a proliferação e migração das células osteoprogenitoras e diferenciação dos osteoblastos. Este processo é controlado por uma cascata de eventos combinados a uma programação genética com a regulação

de genes por fatores sistêmicos e locais, entre eles os hormônios, citocinas e fatores de crescimento[8].

A maioria dos fatores que controla a reabsorção óssea age diretamente nos osteoblastos, tais como PTH, 1,25 dihidroxivitamina D3, esteróides sexuais, prostaglandinas (PGs), citocinas (Interleucina-1, Interleucina-6 e Interleucina-11), TGF-∃. Portanto, estes fatores estimulam os osteoblastos a liberarem moléculas que estimulam a migração e adesão à superfície óssea que deve ser reabsorvida. Sendo assim, os osteoblastos participam do processo de remodelação óssea, não somente produzindo matriz óssea, mas também controlando a atividade dos osteclastos. As citocinas e fatores de crescimento, especialmente o TGF-∃, liberados da matriz durante sua degradação, atuam como uma alça de "feed-back" e desencadeiam a formação e ativação de osteoblastos para sintetizar e depositar uma quantidade equivalente de osso novo na lacuna de reabsorção[3,11].

**Algumas citocinas e hormônios envolvidos na remodelação óssea**

- ***PTH e vitamina $D_3$*** atuam nos osteoclastos, indiretamente, através de receptores nos pré-osteoblastos, osteoblastos e células de revestimento ósseo[8].

- ***Interleucina-1 (IL-1)∀ e fator de necrose tumoral (TNF-∀)*** são citocinas derivadas da linhagem dos monócitos-macrófagos e estimulam a reabsorção óssea através de uma via autócrina. Estimulam os osteoclastos

maduros e a proliferação de seus precursores. Sua ação têm sido demonstrada na reabsorção óssea tanto "in vivo" quanto "in vitro"[35].

- ***Interleucina-6 (IL-6)*** é uma citocina produzida pelos osteoclastos, células do estroma e células da linhagem monócito-macrófago[36]. Aumenta a reabsorção óssea através do estímulo e receptores presentes na membrana celular dos osteoclastos. No entanto, a ação da IL-6 estimulando a reabsorção óssea por via parácrina também foi demonstrada[2]. Aumenta a reabsorção óssea estimulada pela IL-1 e TNF, mas não estimula a reabsorção óssea mediada pelo PTH e 1,25 Dihidroxivitamina D. Anticorpos para IL-6 bloqueiam a reabsorção óssea produzida pela IL-1 e TNF indireta[9]. É também produzida pelas células osteoblásticas em resposta ao PTH e Vitamina $D_3$[8].

A citocinas IL-1, TNF e IL-6 estimulam a produção dos precursores dos osteoclastos, o que leva a um aumento do *turnover* ósseo[36-39].

- ***Antagonista do receptor IL-1*** é uma citocina relacionada à família do gene da IL-1, proveniente da linhagem celular dos monócitos. Liga-se ao receptor da IL-1 e compete com a IL-1∀ e ß pela ligação e ativação deste receptor. É um inibidor muito efetivo da reabsorção óssea osteoclástica, estimulada não apenas pela IL-1, mas pelo TNF[9].

- ***RANKL*** é uma citocina da família do TNF, essencial para a indução da osteoclastogênese[40-41]. Expresso pelas células T ativadas, é uma molécula importante que vem sendo muito estudada no campo da osteoimunologia, que é a interação entre o sistema imune e o sistema esquelético[2]. Também é expresso pelos osteoblastos que se unem com RANK, ativando-os. O

fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), membro da família do fator de transcrição gênica NFAT, é um fator de transcrição gênica fortemente induzido pelo estímulo do RANKL[38].

- ***RANK*** é uma proteína transmembrana, expressa nos progenitores dos osteoclastos, osteoclastos, células T, células B, células dendríticas e células epiteliais da glândula mamária. É um membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR)[42].

- ***Osteoprotegerina (OPG)*** é um membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) que regula negativamente a formação e ativação dos osteoclastos[40,42], interrompendo a ligação RANK-RANKL por ligar-se ao RANKL. Secretada pelos osteoblastos, ao competir com esta ligação é tida como a chave do mecanismo regulatório da diferenciação e atividade osteoclástica[8]. É produzida primariamente pelos osteoblastos e seus precursores, mas também pode ser expresso pelas células B e células dendríticas. Sua produção é aumentada em resposta a IL-1, IL-6, IL-11, TNF, fator de crescimento transformante (TGF-∃) e estrógeno e é inibida pelo PTH[42].

- ***Fator de crescimento transformante-∃ (TGF-ß),*** produzido pelos osteoblastos e células da medula óssea, é o mais abundante dos fatores de crescimento armazenado no osso[43-45]. Este fator estimula a formação óssea, como também pode inibir a diferenciação, formação e atividade dos osteoclastos maduros[46]. Armazenado no osso, é produzido quando há estímulo para reabsorção óssea, podendo ser um mecanismo importante na desativação osteoclástica[9].

- ***Interferon-γ (INF-γ)*** é uma citocina multifuncional, produzida pelas células T, que apresenta tanto a capacidade de proliferação quanto de diferenciação dos progenitores dos osteoclastos. Pode suprimir fortemente a osteoclastogênese por interferir com a via de sinalização RANKL[2,38]. Pode ser um fator crítico na manutenção da integridade óssea através de um processo mediado pelas células T[38].

- ***Interferon-∃ (INF-∃)*** é uma citocina que está seletivamente envolvida na regulação dos osteoclastos e possui um efeito benéfico na destruição óssea, provavelmente regulando negativamente a osteoclastogênese, através de uma sinalização cruzada com a via RANKL[37].

- ***1,25 Dihidroxivitamina D*** é um hormônio da mineralização óssea[47], produzido no rim, sob o comando do PTH, fosfatase e cálcio. Há evidências de que também possa ser produzido pelas linhagens dos linfócitos e monócitos, sendo um importante mecanismo para a formação osteoclástica no espaço medular. Age tanto como um fator de diferenciação nas células progenitoras quanto na célula já madura, provavelmente por ação indireta[9].

- ***Estrógeno*** é um hormônio que suprime a produção de citocinas de reabsorção óssea, como a IL-1 e IL-6[8] e provavelmente inibe a atividade de reabsorção via osteoblastos[11].

- ***Calcitonina*** é um hormônio secretado pela tireóide. Além de diminuir os níveis plasmáticos de cálcio, inibe a proliferação e diferenciação dos precursores dos osteoclastos[8].

As células T expressam RANK, RANKL, INF entre outras citocinas, participando ativamente no processo de osteoclastogênese, sendo que o equilíbrio da produção destas citocinas é primordial no balanço da remodelação óssea, já que determinam o equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos[38].

As células do tecido ósseo estão sob a ação de múltiplos fatores locais e sistêmicos. O conhecimento da ação destes fatores sobre as células ósseas e conseqüentemente da interferência destes fatores sobre o metabolismo ósseo, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em diversas doenças ósseas. Assim, estudos têm sido realizados com a finalidade de encontrar tratamentos efetivos para as doenças que promovem a perda óssea, tais como: doença osteoporótica pós-transplante que acometem pacientes imunossuprimidos, doença periodontal ou osteopatias metabólicas, como a osteoporose e a osteomalácia, entre outras. Assim, os estudos de biologia molecular relacionados ao tecido ósseo visam esclarecer os diversos fatores que interferem com a proliferação, migração, diferenciação, atividade e sobrevivência das células ósseas. No entanto, os estudos revelam que há uma multiplicidade de fatores; além disso, geralmente estes fatores agem de forma coordenada.

A compreensão deste processo, como um todo, pode ser a chave para o desenvolvimento de um protocolo de tratamento que poderia levar ao equilíbrio dessas doenças ósseas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Katchburian E, Arana V. Histologia e Embriologia Oral. Texto-Atlas-Correlações clínicas. Tecido ósseo (cap.3). Editora Guanabara Koogan. 2004; 41-75.

2. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. J Periodont Res. 2005; 40: 287-293.

3. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. São Paulo: Editora Guanabara Koogan; 2004, p. 111-128.

4. Robbins. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: Ramzi S. Cotram, Vinay Kumar, Tucker Collins. Ossos, articulações e tumores de partes moles. Patologia estrutural e funcional. Editora Guanabara Koogan; 2005, p. 1088-1090.

5. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. Int J Biochem Cell Biol. 2003; 35: 1301-1305.

6. Cerri, PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2005; 286: 833-840.

7. Raisz LG, Rodan GA. Embriology and cellular biology of bone. In: Louis V Avioli, Stephen M Krane. Metabolic bone diseases and clinically related disorders. Academic Press. 1998; 1-22.

8. Sodek J, McKee ME. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontology 2000. 2000; 24: 99-126.

9. Mundy, GR. Inflamatory mediators and the destruction of bone. J Periodont Res. 1991; 26: 213-217.

10. Manolagas, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocrine reviews. 2000; 21(2): 115-137.

11. Katchburian E, Cerri PS. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Cirurgia para implantes. São Paulo: Artes Médicas; 2002, p. 437-445.

12. Marks JR SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. Am J Anat. 1988; 183(1): 1-44.

13. Arana-Chaves VE, Soares AMV, Katchburian E. Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron mycroscopy. Arch Histol Cytol 1995, v.58, n.3, 285-292.

14. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. Journal of Cell Biology. 1969; 41: 59-72.

15. Katchburian E. Membrane-bound bodies as initiators of mineralization of dentine. J Anat. 1973; 116: 285-302.

16. Arana-Chavez, VE, Massa, LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2004; 36: 1367-1373.

17. Ten Cate, A.R. Desenvolvimento, estrutura e função. Formação e destruição dos tecidos duros (cap.5) e Osso (cap.7). Ed. Guanabara Koogan; 2001, p. 68-75 e p.101-122.

18. Noble B. Microdamage and apoptosis. European Journal of Morphology. 2005; 42: 91-98.

19. Garcia-Moreno C, Catalán MP, Ortiz A, Alvarez L, De la Piedra C. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. Bone. 2004; 35: 170-177.

20. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of Estrogen on the control of rat osteocyte apoptosis. J Bone Miner Res. 1998; 13: 1243-1250.

21. Palumbo C, Ferretti M, De Pol A. Apoptosis during intramembranous ossification. J Anat 2003, 203: 589-598

22. Miller SC, Jee WSS. The bone lining cell: a distinct phenotype? Calcif Tissue Int. 1987; 41: 1-5.

23. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. J Bone Miner Res. 1998; 13(5): 793-802.

24. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. Tissue Cell. 2001; 33(4): 318-325.

25. Sodek J, Overall CM. Matriz metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. Matriz. 1992; 1(suppl): 352-362.

26. Fukushima O, Bekker PJ, Gay C. Characterization of the functional stages of osteoclasts by enzime histochemistry and electron microscopy. The Anatomical Record. 1991; 231: 298-315.

27. Elmardi AS, Katchburian MV, Katchburian E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. Calcif tissue Int. 1990; 46: 239-245.

28. Taniwaki NN, Katchburian E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells. Cell Tissue..1998; 293: 173-176.

29. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. J Periodontal Res. 2003; 38:223-226.

30. Tanaka K, Yamaguchi Y, Hakeda Y. Isolated chick osteocytes stimulated formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells. J Bone Miner Metab 1995, 13: 61-70.

31. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Daí A. Recent advances in bone biology provide insight into pathogenesis of bone diseases. Lab Invest 1999; 79: 83-94.

32. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM,Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, DeLange RJ. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. Proc Natl Acad Sci USA. 1984; 81(2): 371-475.

33. Dimitriou R, Gionnoudis PV. Discovery and development of BMPs. Int J Care Injured. 2005; 36S: S28-S33.

34. Cao X, Chen Di. The BMP signaling and in vivo bone formation. Gene. 2005; 357: 1-8.

35. Tani-ishii N, Tsunoda A, Teranaka T, Umemoto T. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1∀ and TNF∀. J Dent Res. 1999; 78(10): 1617-1623.

36. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. Exp hematol. 1999; 27: 1229-1241.

37. Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. Arthritis Res. 2002; 4(suppl 3): S227-S232.

38. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and INF-γ. Nature. 2000; 408: 600-605.

39. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res. 1996; 11: 1043-1048.

40. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998; 93: 165-176.

41. Yasuda H, Shiman N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 3597-3602.

42. Rho J, Takami M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems. Mol Cells. 2004; 17(1): 1-9.

43. Noda M, Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor beta. Endocrinology. 1989; 124: 2991-2994.

44. Marcelli C, Yates AJ, Mundy GR. In vivo effects of human recombinant transforming growth factor beta on bone turnover in normal mice. Calcif Tiss Int. 1990; 46: A40-A41.

45. Goodman GR, Dissanayake IR, Bowman AR, Pun S, Ma Y, Jee WSS, Bryer HP, Epstein S. Transforming growth factor-ß administration modifies cyclosporine-A induced bone loss. Bone. 2001; 28(6): 583-588.

46. Epstein S, Schlosberg M, Fallon M, Thomas S, Movsowitz C, Ismail F. 1, 25 dihidroxivitamin D3 modifies cyclosporine-induced bone loss. Calcif Tissue Int. 1990; 47(3): 152-157.

47. Mirosavljevic D, Quinn JM, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, Gillespie MT. T- cells mediate an inhibitory effect of interleukin-4 on osteoclastogenesis. J Bone Miner Res. 2003; 162: 1018-1023.

# Artigo 2

# The influence of CsA and FK506 based immunosuppression on alveolar bone: a histometric, stereometric and ultrastructural study

*Denise Carleto Andia (Andia, DC)**

*Carlos Augusto Nassar (Nassar, CA)**

*Patrícia Oehlmeyer Nassar (Nassar, PO)**

*Morgana R Guimarães (Guimarães, MR)****

*Paulo Sérgio Cerri (Cerri, PS)***

*Luis Carlos Spolidorio (Spolidorio, LC)****

Department of Periodontology*, Department of Morphology**, Department of Physiology and Pathology***, Dental School, Araraquara, University of State of São Paulo, Brazil.

**Corresponding author: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**

University of State of São Paulo – UNESP

Dental School - Rua Humaitá, nº 1680, caixa postal 331,

Araraquara, SP – Brazil - CEP: 14801–903

Department of Morphology

Phone: + 55 16 33016497 Fax: + 55 16 33016433

e-mail: **pcerri@foar.unesp.br**

**Running title –** The influence of CsA and FK506 on alveolar bone

*** Article submitted to Journal of Periodontal Research**

**Abstract**

*Background and objectives:* A frequent complication reported in patients following organ transplantation is the development of osteopenia and it has been suggested that immunosuppressive therapy may be an important factor in the development of post-transplant bone disease. The purpose of this study was to describe the histometry, stereometry of the alveolar bone and the ultrastructure of osteoblasts and osteoclasts of rats treated with CsA or FK506.

*Material and Methods:* Rats were treated with a daily subcutaneous injection of 10mg/kg body weight of CsA or with 1mg/kg body weight of FK506 for 60 days. At the end of experimental period, rats were sacrificed and after histological processing, stereometric parameters: number of multinucleated osteoclasts/mm, number of osteoblasts/mm, alveolar bone ($V_{bo}$), marrow ($V_m$) and other structures ($V_o$) were assessed at the furcation region of the first upper molar as well as histometric parameters: linear distance of the alveolar bone surface and ultrastructural parameters of osteoclasts and osteoblasts were analysed.

*Results:* The results confirmed that CsA causes a more severe alveolar bone loss than FK506. The therapy with CsA decreased the number of osteoblasts/mm and $V_{bo}$ and increased the number of multinucleated osteoclasts/mm and $V_{m.}$ However, the systemic therapy with FK506 induced the decrease in multinucleated osteoclasts/mm, but mainted $V_{bo}$ and $V_{m.}$ The surface of the alveolar bone exhibited numerous deep excavations associated with multinucleated osteoclasts that exhibiting typical ruffled border, abundant mitochondria and vacuoles were

closely apposed to irregular surfaces of the bone. Occasionally, the deep excavations contained some osteoblasts that appeared to be producing a collagen-rich extracellular matrix on the previously resorbed bone surface. On the other hand, FK506-treated rats showed a continuous layer of active osteoblasts with well-developed rough endoplasmatic reticulum. The few multinucleated osteoclasts appeared to be detaching from the previously reabsorbed bone lacuna. The excavated bone surfaces were often filled by active osteoblasts and rich-collagen matrix.

*Conclusions:* Our data indicate that at 60 days, it is possible to suggest that the CsA induced imbalance bone metabolism is associated with a tendency in increasing the osteoclast number, decreased in the $V_{bo}$ and increased in the osteoclast metabolism. CsA and FK506 can imbalance the bone metabolism at the furcation region in rats, by altering the balance between the number of osteoblasts and osteoclasts, but FK506 unlike CsA is not associated with alveolar bone loss.

**Keywords -** cyclosporine, tacrolimus, osteoclasts, osteoblasts

## Introduction

Cyclosporin-A (CsA) and Tacrolimus (FK506) are drugs used as an immunosuppressant protocol pos-transplant (1,2) and inhibit the immune function by blocking the enzyme activity of calcineurin and the nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1). This inhibition occurs by complexes formed with their respective binding proteins: cyclophilin and FK506-binding protein12 (FKBP12) (3), reducing the expression of interleukin and other cytokines, as well as activating the T lymphocyte (3-6). The development of osteopenia and pathologic fractures is a frequent complication reported in patients following organ transplant (4,7), but it is still unclear the contribution of these immunosuppressant drugs to the occurrence of bone loss and how the imbalance of the bone turnover happens.

Some studies using CsA have shown an increased in bone turnover and a decrease in bone mass with biochemical and morphological changes (8-10). Some results of high turnover that leads to an osteopenia state have been reported in rats treated with FK506 (5,11,12) and others suggests an increase in bone metabolism without changes in bone density (13-19).

Osteoclasts are multinucleated cells, derived from hematopoietic precursors, which breakdown and reabsorb bone matrix (20,21). Otherwise, osteoblasts- differentiated from mesenchymal progenitors - are responsible for the formation and mineralization of the bone tissue (22,23). The coordinate interaction between osteoblasts and osteoclasts plays a significant role in the

maintenance of bone homeostasis (21,24). The imbalance between osteoclasts and osteoblasts could lead to bone diseases, such as osteoporosis or osteopetrosis (25,26), and an increased metabolism (27), through change of number and activity of these cells and it is possible that this imbalance can be related with the inhibition of the nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1), identified as the master transcription factor for osteoclastogenesis (27).

The effect of FK506 on the bone metabolism is conflicting and some authors have reported a tendency for the bone tissue, under the FK506 influence, to conserve the structural and biochemical integrity (19), even with the increased metabolism. The aim of this study was to describe the histometry and stereometry of the alveolar bone and the ultrastructure of the osteoclasts and osteoblasts of rats that were treated with CsA or FK506.

## Material and methods

### Animals

Thirty, 4-week-old male Holtzman rats (*Norvegicus albinus*) weighing an average of 100g were selected and randomly distributed into three groups of ten animals each. The rats were housed in polypropylene cages in groups of five animals per cage at controlled temperature (23±2°C) and humidity (55%±10%) and 12/12 hours light/dark cycle beginning at 7:00 a.m. Standard chow and tap water were available *ad libitum*. All the protocols described below were approved by the local Ethics Committee of the School of Dentistry of Araraquara, São Paulo, Brazil.

### Drugs

The animals received daily doses of either 10mg/kg body weight of CsA (Sandimmun, Neoral, Novartis, Brasil), 1mg/kg body weight of FK506 (Prograf, Janssen-Cilag-Brasil) or saline (control group) as subcutaneous injections (28,29). The rats were weighed weekly and monitored for abnormal appearance of coat and abnormal level of activity and all rats were sacrificed 60 days after the beginning of the treatments.

**Stereological analysis (Figure A)**

The upper maxilla was carefully removed and the right side was decalcified in solution of Morse (50 mL of 50% formic acid and 50 mL of 20% sodium citrate). Serial paraffin sections of 5µm were made on the buccal-lingual aspects and stained with hematoxylin and eosin. *Volume densities of alveolar bone ($V_{bo}$), bone marrow ($V_m$) and other structures ($V_o$)* (dentin, cementum and periodontal ligament) were estimated according to the principles established by Dellesse (30), which were applied to histology by Weibel (31). The capture of the images was performed by a digital camera Olympus Camedia C 5060, coupled with a Olympus BX 51 light microscope, using a magnification of x40. A square lattice of 120 points was projected over each image in the furcation region of the first upper molar and the points of coincidence were counted (bone, bone marrow and other structures). For each animal, 8 sections were used and 120 points were counted in each section. $V_{bo,}$ $V_m$ and $V_o$ were expressed as percentage of the total points counts. To confirm the results, other two parameters were defined for these same sections. Over the bone surface, from the one apical region to another one, the *number of osteoclasts-like cells (oc/mm) and the number of active osteoblasts-like cells (ob/mm)* were counted using an Olympus X 51 light microscope in each section for each animal (8 sections/animal), using a magnification of x400. The data was expressed in oc/mm and ob/mm.

The Stereological and Histometric analysis were made by a single-blind and calibrated examiner.

**FIGURE A- Square lattice of 120 points was projected over each image in the furcation region of the first upper mollar and the points of coincidence was counted (bone, marrow and other structures); $V_{bo,}$ $V_m$ and $V_o$ were expressed as percentage of the total points counts; magnification x40.**

**Histometric analysis (Figure B)**

The same images used in the stereologic analysis were used to perform the histometric analysis. To access the *linear distance of the alveolar bone surface*, a line was drawn on the bone surface in the furcation region, from one apical region to another one, using an image analysis system (Image Tool, 3.0 version). The data was expressed in mm.

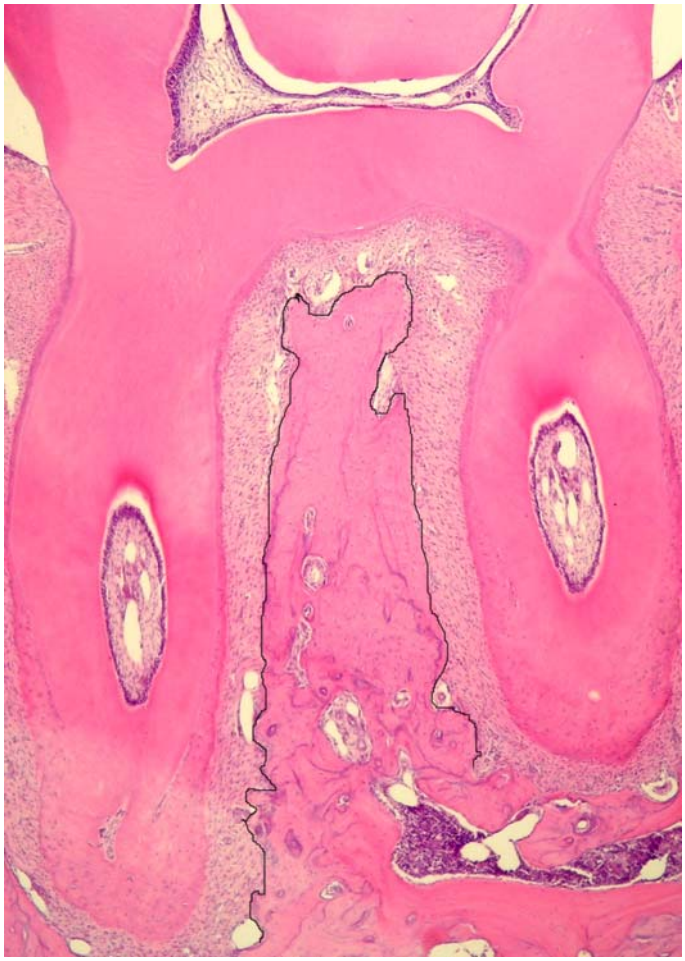


Figure B – A line was drawn on the bone surface in the furcation region, from one apical region to another one. The data was expressed in mm.

**Statistical analysis**

Comparisons between groups regarding stereologic and histometric data were made using the one-way analysis of variance (ANOVA) and when ANOVA test showed significant differences, pairwise multiple comparisions were used (Tuckey test). Significance level was always set at 99%.

**Ultrastructural analysis**

Fragments of the left maxilla containing the upper first molar were fixed in a mixture of 4% glutaraldehyde and 4% formaldehyde (from paraformaldehyde) buffered at pH 7.2 with 0.1M sodium cacodylate at room temperature for 24 hours. After the decalcification for 45 days in 7% EDTA containing 0.5% formaldehyde buffered at pH 7.2 in sodium cacodylate 0.1 M, the specimens were washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). They were transferred to cacodylate-buffered 1% osmium tetroxide at pH 7.2 for 1-1.5 h at room temperature and subsequently treated with aquous 2% uranyl acetate for 2 h. After dehydration in graded concentrations of ethanol, the specimens were treated with propylene oxide and then embedded in Araldite. Toluidine-stained semithin sections (250-280 μm) were examined under a light microscope for selection of regions to be trimmed. Ultrathin sections (90μm) were collected onto grids and stained with uranyl acetate and lead citrate before examination in a Zeiss EM10 transmission electron microscope.

## Results

### *Stereologic and histometric findings*

Figure 1 shows *volume densities of alveolar bone ($V_{bo}$), bone marrow ($V_m$)* and *other ($V_o$)* of the CsA-treated rats, FK506-treated rats and control group. The $V_{bo}$ was lower in CsA-treated rats (41% ± 6), than it was verified in the control group (54% ± 4) and FK506 (50% ± 5) ($P$<0.01). There were no statistical difference between FK506-treated rats and control group. On the other hand, the $V_m$ was greater for the CsA-treated rats (14% ± 5) than FK506 and control groups (7.4% ± 4 and 7.5% ± 3, respectively) (fig.1). There was no statistical difference amongst all groups for the evaluation of the $V_o$ (CsA 44% ± 6, FK506 42% ± 7 and control 37% ± 6) (P<0.01) (fig.1). The *linear distance of the alveolar bone surface* was greater in the CsA-treated rats (4.3mm ± 0.71). There were no difference between FK506-treated rats and control group (3.9mm ± 0.65 and 3.8mm ± 0.88 respectively) (fig.2).

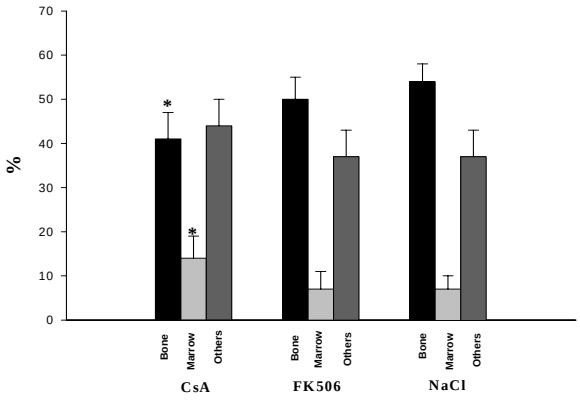



FIGURE 1 – Volume densities of alveolar bone ($V_{bo}$), bone marrow ($V_m$) and other ($V_o$) (%) of the furcation area of the first upper molar of the rats treated with CsA, FK506 or NaCl, at 60 days. Difference was assessed by using ANOVA and Tukey test ($P$<0.01). * Significant difference for the CsA group in comparison with FK506 and control group.

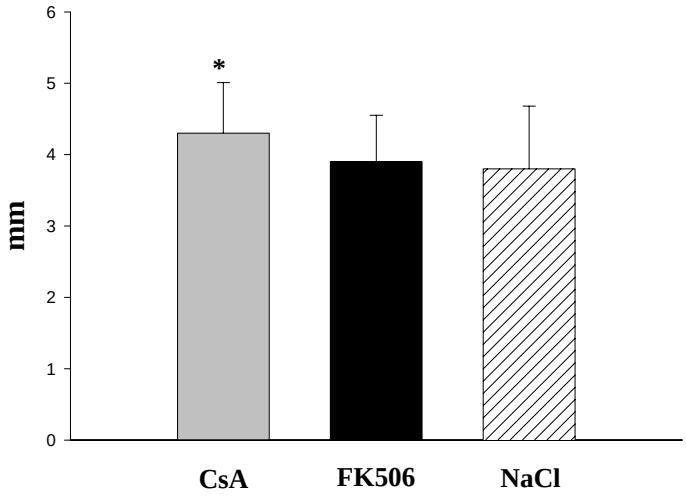



FIGURE 2 - Distance (mm) of alveolar bone surface of one apical region to another one on furcation area of the first upper molar of the rats treated with CsA, FK506 or control, at 60 days. Difference was assessed by using ANOVA and Tuckey test ($P$<0.01). * Significant difference for the CsA group in comparison with FK506 and control group.

The oc/mm was assessed in all groups and is demonstrated in fig. 3. The FK506-treated rats showed a decrease in the oc/mm when compared to CsA-treated rats and control group (0.9oc/mm ± 0.43, 2.6oc/mm ± 0.97 and 2.52oc/mm ± 0.77, respectively) (P<0.01). The ob/mm was lower in the CsA-treated rats (20.84ob/mm ± 4.5) (P<0.01) (fig. 4), with significant difference in regards to the other groups. There were no statistical difference between FK506-treated rats (28.26ob/mm ± 7.4) and control group (32.60ob/mm ± 8.0) (fig.4).

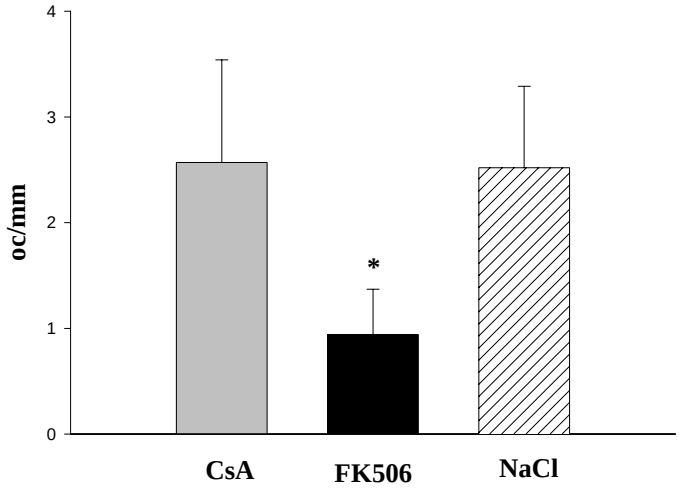



FIGURE 3 – Number of osteoclasts/mm of alveolar bone surface of one apical region to another one on furcation area of the first upper molar of the rats treated with CsA, FK506 or NaCl, at 60 days. Difference was assessed by using ANOVA and Tukey test ($P$<0.01). * Significant difference for the FK506 group in comparison with CsA and control group.

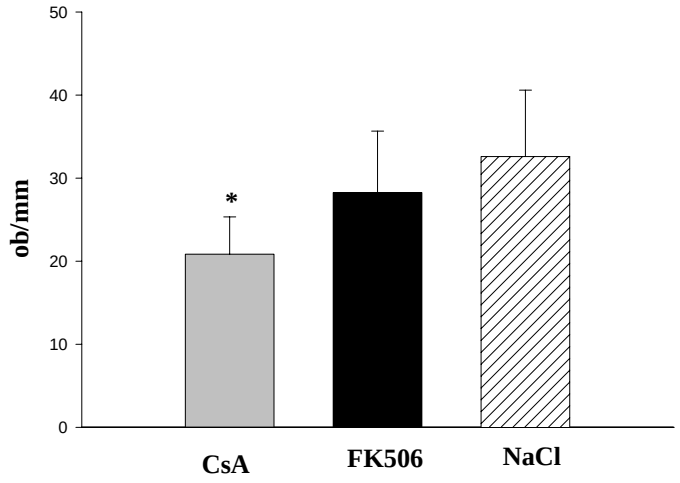
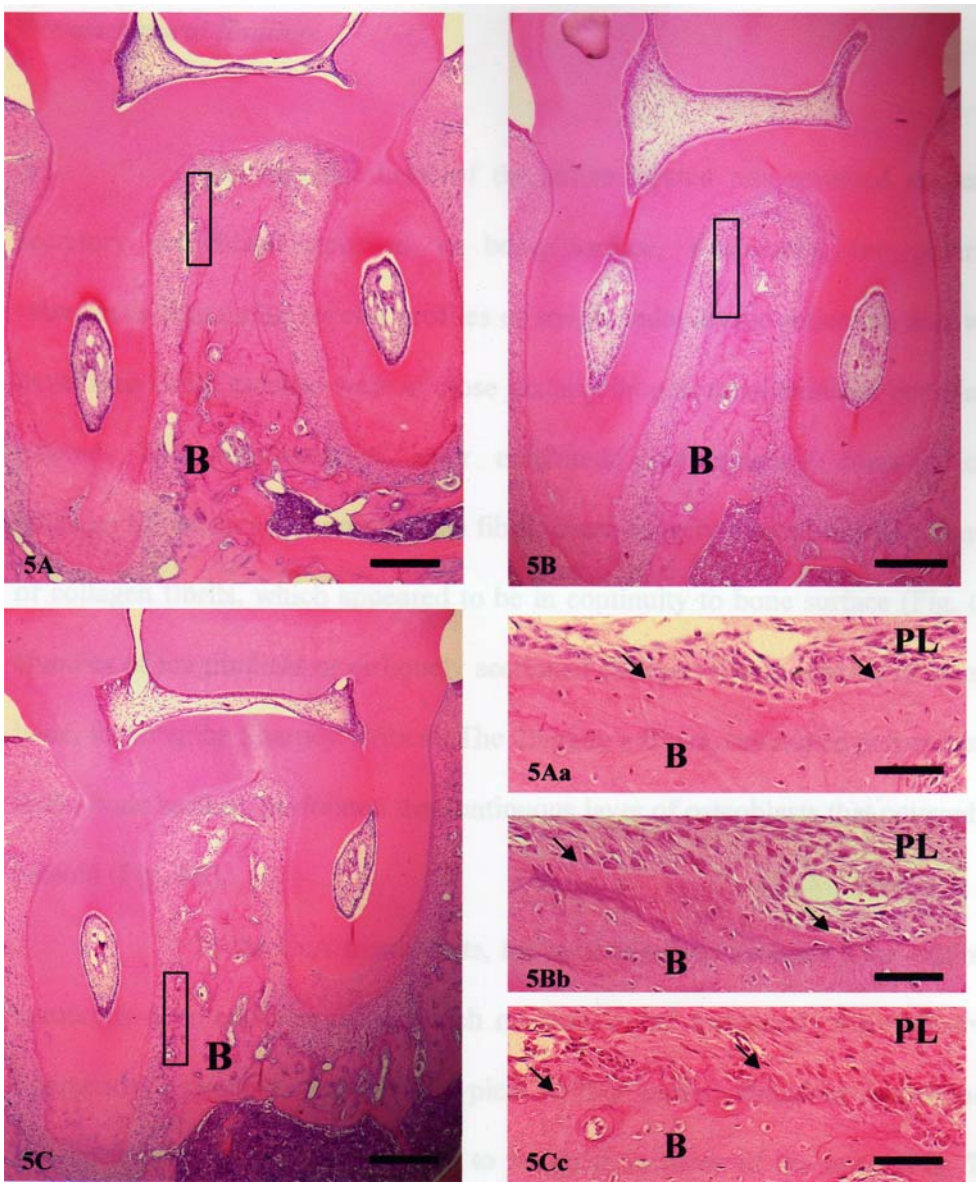



FIGURE 4 – Number of osteoblasts/mm of alveolar bone surface of one apical region to another one on furcation area of the first upper molar of the rats treated with CsA, FK506 or NaCl, at 60 days. Difference was assessed by using ANOVA and Tukey test ($P$<0.01). * Significant difference for the CsA group in comparison with FK506 and control group.

***Microscopy findings***

The outer cortical plate, facing the lips and cheeks, and the inner cortical plate, facing the tongue and palate, consist of a compact and lamellar bone. The bone around the root is a layer of relatively compact bone and it is called the alveolar bone or cribriform plate, because of the many small openings for blood vessels and nerves that communicate between the marrow spaces and the periodontal ligament. Between the cortical plates and the alveolar bone or cribriform plate, spongy bone is present. Spongy bone consists of a sparse number of bone trabeculae running inside bone marrow. The sockets of two roots of a multi-rooted tooth are separated from each other by an interradicular septum. This septum consists of the cribriform plates of both roots and spongy bone. The spongy bone of control rats and FK506-treated rats (Fig. 5A and 5B) were similar and the bone surface was continuous and regular (Fig. 5Aa and 5Bb). The spongy bone of the CsA-treated rats (5C) showed increased marrow spaces and the bone surface showed numerous irregularities and excavations (Fig. 5Cc).




FIGURES 5A, 5B e 5C - Lights micrographs of furcation region of the first upper molar stained by hematoxylin and eosin. FIG. 5A is a first upper molar of the control group, with regular trabeculae and marrow spaces in between. Bar: 250µm. FIG. 5Aa shows regular bone surface (arrows). Bar: 50µm. FIG. 5B is the first upper molar of the FK506-treated group with regular trabeculae and marrow spaces in between. Bar: 250µm. FIG. 5Bb shows continuous and regular bone surface (arrows), similar to the control group. Bar: 50µm**.** FIG. 5C is a first upper molar of the CsA-treated group, with decreased bone mass containing several marrow spaces. Bar: 250µm. FIG. 5Cc showed irregular bone surface (arrows). Bar: 50µm. PL – periodontal ligament; B – alveolar bone.

***Ultrastructural findings***

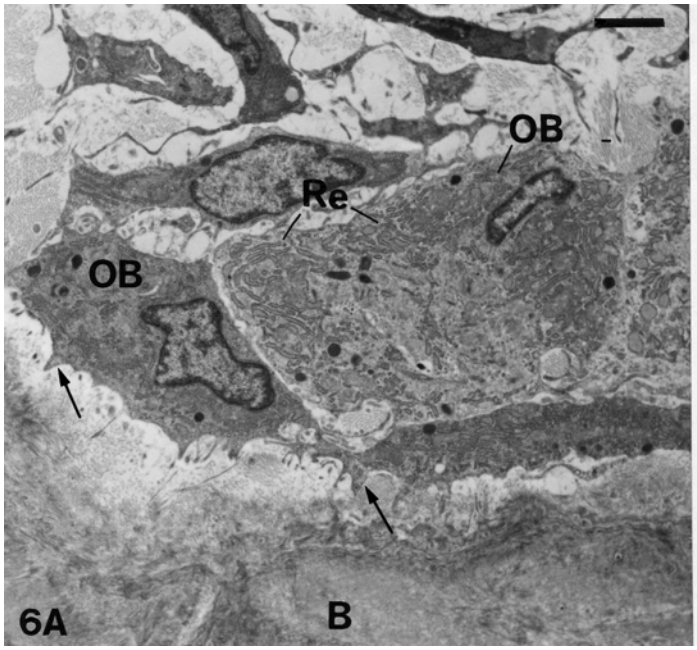
The alveolar bone of the saline treated rats revealed numerous secretory osteoblasts apposed to bone surface. Frequently, the polarized osteoblasts containing several profiles of rough endoplasmic reticulum and well-developed Golgi saculles were in close juxtaposition to unmineralized bone layer, osteoid. The unmineralized layer exhibited predominantly cross-sectioned collagen fibrils; in some areas, these fibrils were densely packed forming bundles of collagen fibrils, which appeared to be in continuity to bone surface (Fig. 6A). Bundles of longitudinal or obliquely sectioned collagen fibrils penetrated into the bone, forming the Sharpey´s fibers. The Sharpey´s fibers, orientated perpendicular to the bone surface, perforated the continuous layer of osteoblasts that covered the osteoid (Fig. 6B).

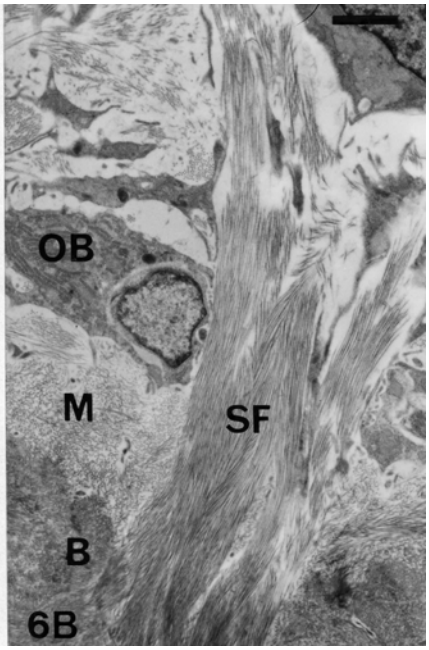
In the CsA treated rats, the surface of the alveolar bone exhibited numerous deep excavations in which multinucleated osteoclasts were observed. Frequently, osteoclasts exhibiting typical ruffled border, abundant mitochondria and vacuoles were closely apposed to irregular surfaces of the bone (Fig. 7A). Large and multinucleated osteoclasts were also found next to excavated surfaces of the bone. These detached osteoclasts exhibited elongated shape, irregular nuclei and mitochondria sparsely distributed in their cytoplasm (Fig. 7B). An electron-opaque line often limited the irregular surfaces of the reabsorbed bone (Figs. 7B and 7C). Occasionally, the deep excavations contained some osteoblasts that appeared to be producing a collagen-rich extracellular matrix on the previously

reabsorbed bone surface (Figs. 7B, 7C and 7D). Sometimes, irregular electron-opaque lines, typical reversal lines, were bounding the thin layer of newly formed bone of the original bone (Fig. 7D).

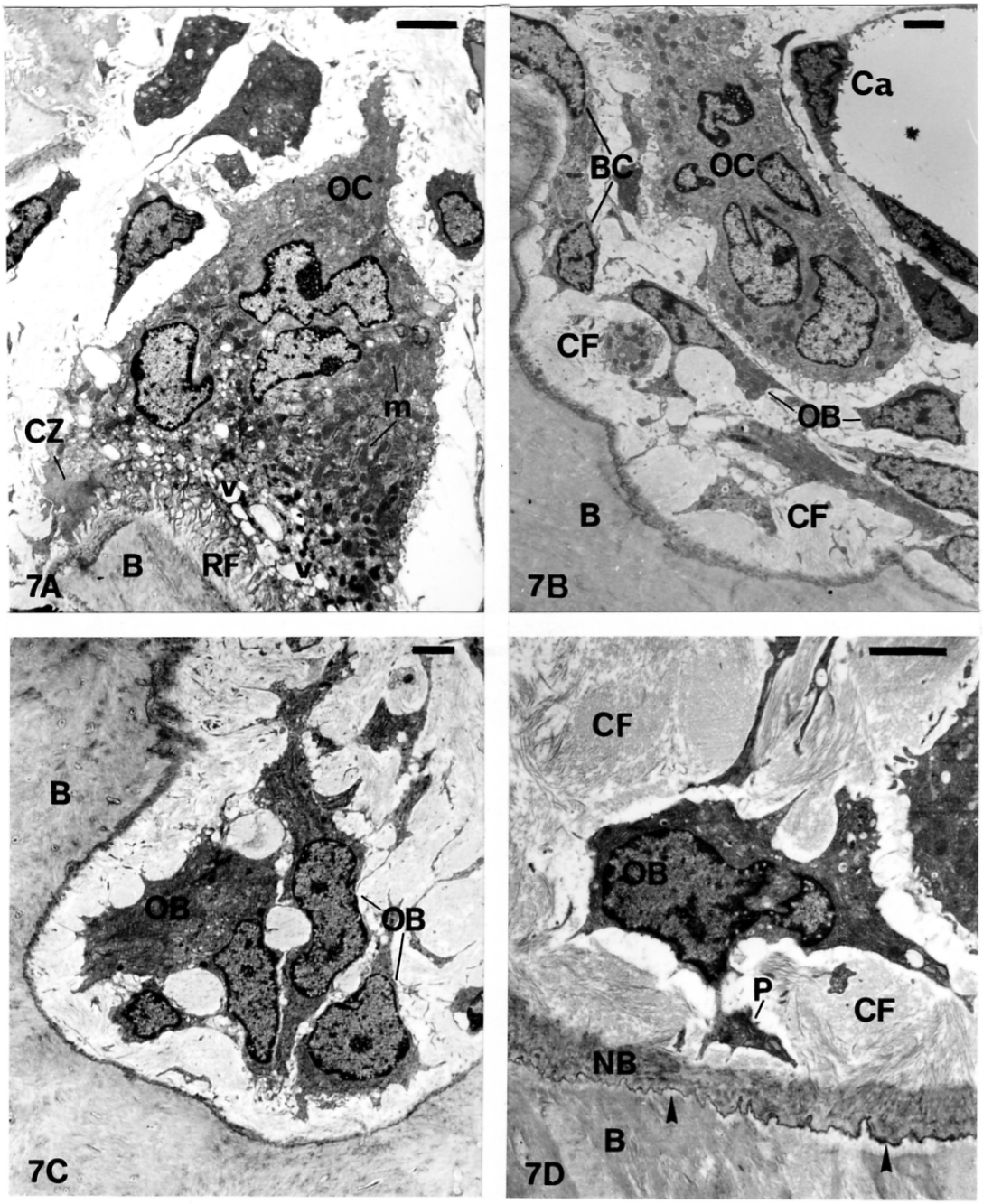
Generally, the alveolar bone surfaces of the FK-506 treated rats showed a continuous layer of active osteoblasts with well-developed rough endoplasmic reticulum. These large and polarized osteoblasts were in close juxtaposition to unmineralized bone matrix containing numerous collagen fibrils (Fig. 8A). The scarce multinucleated osteoclasts were also observed on the bone surface; some of these cells appeared to be detaching from the previously reabsorbed bone lacuna (Fig. 8B). The excavated bone surfaces were often filled by active osteoblasts and rich-collagen matrix (Fig. 8B). In these areas in which active bone formation took place, the electron-opaque lines - typical of reserval lines - were present in the bone. Sometimes, osteoblasts exhibiting short cytoplasmic projections were surrounded by bundles of collagen fibrils densely packed (Fig. 8C).

**Figures 6A and 6B –** Electron micrographs showing portions of alveolar bone from saline treated rats. In **fig. 6A**, a continuous layer of secretory osteoblasts (OB) is in close juxtaposition to surface of the alveolar bone (B). These polarized osteoblasts (OB) exhibit large cytoplasm containing numerous profiles of rough endoplasmic reticulum (Re) and some cytoplasmic projections (arrows) towards the bone matrix. Bar: 2.0µm. In **fig. 6B,** a bundle of longitudinal or obliquely sectioned collagen fibrils (SF) penetrate into the bone (B). Portion of osteoblast (OB) is apposed to a layer of unmineralized matrix (M) which covers the surface of the bone (B). Bar: 2.5 µm.

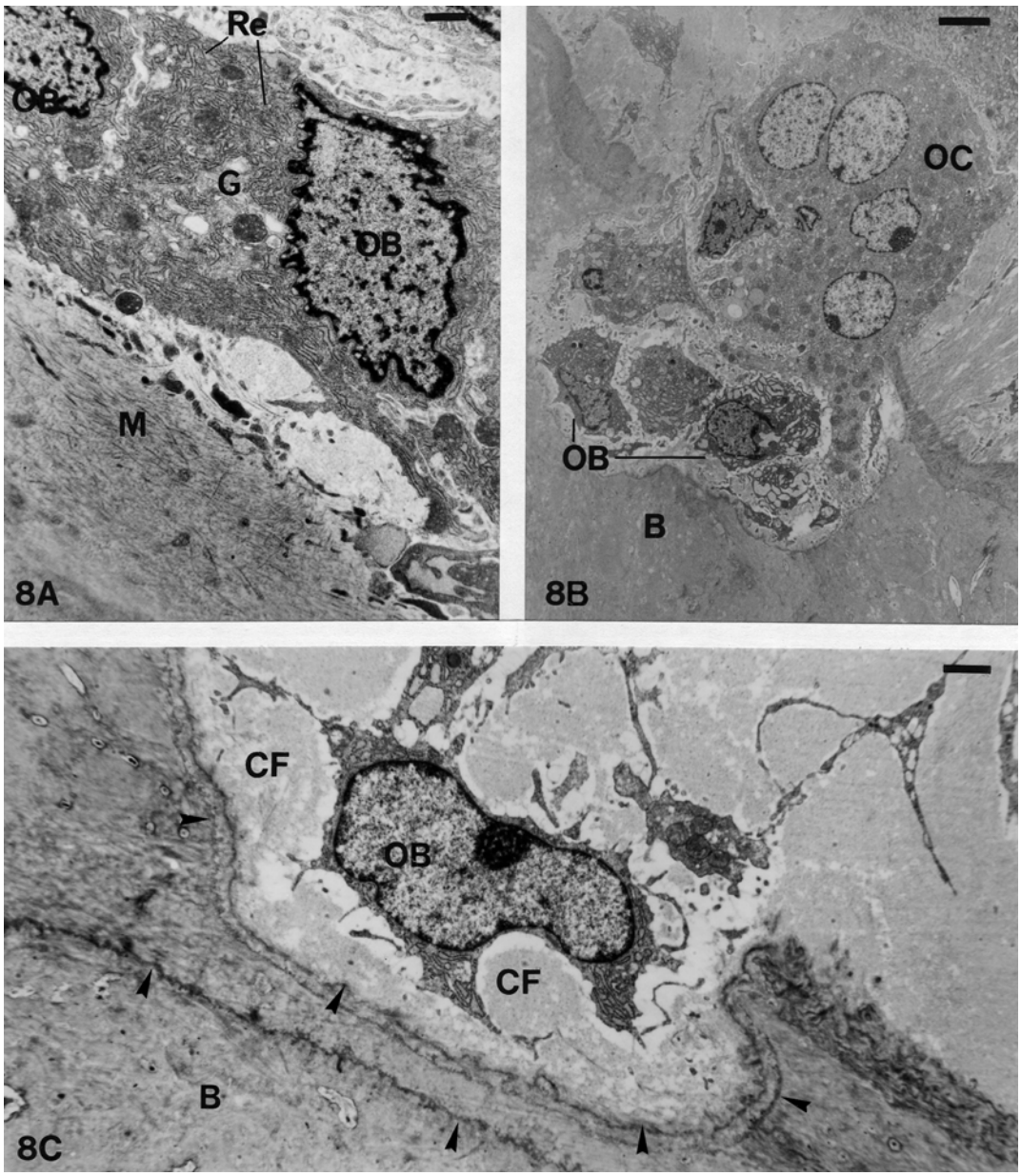

OB
Re
OB
6A
B


OB
M
SF
B
6B

**Figures 7A, 7B, 7C and 7D –** Electron micrographs showing portions of alveolar bone from CsA treated rats. In fig. 7**A**, a multinucleated osteoclast (OC) exhibiting typical ruffled border (RF) and clear zone (CZ) is apposed to the surface of the bone (B). This osteoclast (OC) contains numerous mitochondria (m) distributed throughout the cytoplasm and vacuoles (v) of varied sizes, which are mostly next to ruffled border (RF). Bar: 3.0µm. In **fig. 7B**, irregular osteoblasts (OB) are present on a material rich in collagen fibrils (CF) that covers partially an excavated surface of the bone (B). Portions of osteoblasts/bone lining cells (BC) are also observed in close juxtaposition to the bone surface (B). A multinucleated osteoclast (OC) is observed next to bone excavation. (Ca) Blood capillary. Bar: 2.5µm. The **fig. 7C** shows a deep excavation in the surface of the bone (B). Irregular osteoblasts (OB) are observed in this bone excavation (B) in close association to collagen fibrils, which are forming a thin layer on the bone surface. Bar: 2.5µm. The **fig. 7D** shows an osteoblast (OB) surrounded by numerous cross or obliquely sectioned collagen fibrils (CF) which extend a projection (P) towards to bone surface. A layer of newly bone (NB) is covering the original bone (B); an irregular and electron opaque line (arrowheads) is observed between the newly (NB) and original bone (B). Bar: 2.5µm.


OC
CZ
m
v
B
RF
v
7A
Ca
BC
OC
CF
OB
B
CF
7B
B
OB
OB
7C
CF
OB
P
CF
NB
B
7D

**Figures 8A, 8B and 8C –** Electron micrographs showing portions of alveolar bone from FK506 treated rats. In the **fig. 8A**, portions of typical osteoblasts (OB) exhibiting numerous rough endoplasmic reticulum cisternae (Re) and well-developed Golgi apparatus (G) are juxtaposed to a layer of unmineralized bone matrix - osteoid (M). This unmineralized bone layer (M) is formed by numerous profiles of cross or obliquely sectioned collagen fibrils. Bar: 0.5µm. In **fig. 8B**, a deep excavation in the surface of the bone contains some apparently active osteoblasts (OB). A multinucleated osteoclast (OC) showing irregular shape appears to be detaching from the surface excavated of the bone (B). Bar: 2.0µm. In **fig. 8C**, an excavation in the surface of the alveolar bone contains an irregular osteoblast (OB). Numerous collagen fibrils (CF) are packed around the osteoblast (OB). In the excavated region, the alveolar bone exhibits three electron opaque lines (arrowheads) indicating the continuous deposition of the bone matrix. Bar: 1.0µm.


Re
OB
G
DB
M
8A
OC
OB
B
8B
CF
OB
CF
B
8C

**Discussion**

This study was designed to describe the characteristics of the alveolar bone under treatment with immunosuppressant agents, CsA or FK506, in rats. During the experiment, the rats presented normal level of activity and appearance of coat. The CsA and FK506-treated animals showed a decrease in weight when compared to the control group, without statistic difference. The period of treatment was based on previous observations and the chosen dose of 1mg/kg body weight of FK506 and 10mg/kg body weight of CsA was sufficient to achieve therapeutic drugs serum levels (29). The dose of FK506 (1mg/kg body weight) is clinically relevant and within the range of doses used in studies on organ and limb transplants as well as the ones used in studies on bone metabolism usually between 0.6 and 1.0 mg/kg body weight (32-34). CsA injected subcutaneously for 60days, in a dose of 10mg/kg body weight (28,35) gives estimated peak and trough levels of 1000 mg/mL and 750 mg/mL, respectively. All the rats used in this experiment, responded positively and uniformly to treatments. In fact, many variables are better controlled in rats such as genetic predisposition, gender, age, dose and duration of treatment.

Duration of the treatment with CsA seems to be an important variable for bone metabolism. Schlosberg et al. (36) and Spolidorio et al. (10) showed that the effect of CsA on bone metabolism is dependent on the duration of treatment and the increased bone reabsorption seems to be more accentuated in short periods (60 and 120 days) that long periods (180 and 240 days). The present

study confirmed that 60 days of CsA administration, in doses that have been reported to be immunosuppressive in the rat (37), induced bone loss. Bone loss was represented by a tendency in increasing osteoclast-like cell number and decreasing osteoblast-like cell number. Deep excavations observed in alveolar bone surfaces suggest that the CsA induces bone reabsorption. Although there has been only a tendency of increase in osteoclast-like cell number, it is possible to suggest that these cells presented high metabolic activity, suggested by ultrastructural images. The osteoclast cells of rats treated with CsA showed typical ruffled border and numerous mitochondria when compared to the control rats and the FK506-treated rats, indicating osteoclast activity and therefore intense bone reabsorption. At the same time, a significant decrease in the number of osteoblast-like cells were observed, suggesting that CsA may cause disturbance in the balance between osteoclasts and osteoblasts, which are responsible for the homeostasis on bone tissue. In addition, bone formation on previously reabsorbed bone surfaces was rarely observed. As a result, the present findings confirm the idea that CsA inhibits bone formation and concomitantly promotes the bone reabsorption what resulted in the reduction of the bone mass.

Some studies *in vitro* showed inhibition on bone reabsorption (38,39) that are conflicting with some *in vivo* studies (8-10) and it may be due to the fact that the whole animal is more representative of the influence of interactions between CsA and immune system when compared with local factors studied *in vitro* systems (39). The differentiation and function of osteoblasts and osteoclasts are tightly regulated by growth factors and cytokines and the loss of

this balance caused by CsA immunosuppressant treatment may lead to bone diseases, like osteoporosis post transplant. It is possible to suggest that CsA, reducing the expression of interleukin as well as T lymphocyte activation can imbalance the action of bone forming-osteoblasts and bone reabsorbing-osteoclasts, unbalancing the homeostasis of bone tissue. In the present study, the data suggest that CsA decreased osteoblast-like cells number while osteoclast-like cells showed an increased activity, since our results showed a decrease in the volume density of alveolar bone.

The FK506-treated rats showed maintenance on volume densitiy of alveolar bone. This may be explained by the maintenance of osteoblast-like cell number, comparing to the control group, frequently observed as a continuous layer on bone surface. Besides, the osteoblasts were founded on excavated bone surfaces and showed features of active cells, such as a fairly rough endoplasmic reticulum and well-developed Golgi sacules (22,23). In addition, a newly forming bone matrix was observed between these active osteoblasts and the irregular bone surfaces. Therefore, these ultrastructural findings indicated that the osteoblasts are producing new bone matrix on previously reabsorbed bone surfaces; this idea is reinforced by the presence of reverse lines observed in the alveolar bone. On the other hand, there was a decrease in the osteoclast-like cells number adjacent to alveolar bone surface. In addition, the ultrastructural examination revealed that some osteoclasts were detached from the bone surface indicating that these cells were inactive. Therefore, the typical osteoclasts exhibiting ruffled border were occasionally observed. Thus, it is reasonable to suggest that the FK506 may have

the ability to reduce bone resorption activity, acting on the bone tissue remodeling process, as described by Inoue et al. (13). It has been suggested that FK-506 may have positive effects on bone metabolism, regarding to CsA. The data of this study are in line with the findings of Yoshikawa et al. (40) and Tang et al. (2001) (41) that suggest a positive effect of FK506 in the osteoblast differentiation. It can be inferred that the osteoclastogenesis pathway, through signaling calcium pathway, can be more affected by the FK506 than by the CsA.

The signaling calcium pathway is one of the pathways that leads to the induction and activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1, the master transcription factor of osteoclastogenesis (27). This fact led us to recognize how important is the signaling calcium-calcineurin pathway on the osteoclastic differentiation. NFATc1, when translocates into the nucleus, connect to the promoter region of interleukin genes, like interleukin-2 (IL-2), Interferon (INF), interleukin-1∃ (IL-1∃) and necrosis tumor factor (TNF-∀) causing their transcription and secretion (42,6).

Since CsA and FK506 are immunosuppressant agents that inhibit calcineurin activity, an enzyme calcium dependent, they interfere with signaling calcium pathway, inhibiting the transcription of NFATc1 and consequently causing no only osteoclastogenesis (27) but also the inhibition of secretion of these cytokines (5,6).

In the present study was possible to observe a significant decrease in the number of osteoclasts-like cells in FK506 treated rats and it can be explained by the mechanism of action above described. On the other hand, the

CsA-treated rats showed a decrease in the osteoblast-like cell number, accompanied by a reduction in the bone volume. So it is possible to suggest that, although both immunosuppressant agents are calcineurin inhibitors and exert their effects in the immune system by similar pathways, they can promote different results. The different effects on osteoblasts cellular proliferation and differentiation could be explained by their distinct pathways, after forming the complexes with their respective proteins (43). However, the exact mechanisms of action of these immunosuppressant agents are still unclear and needs to be clarified. In summary, the present data suggest that the rats treated with CsA showed bone resorption greater than bone formation, associated with increased activity of osteoclasts and a tendency in increasing the osteoclasts number and a decrease in the osteoblasts number. On the other hand, the FK506 treated rats showed a bone formation that overlapped the bone resorption, confirmed by the increased activity and number of osteoblasts and decreased osteoclasts number. Our data indicate that at 60 days, it is possible to suggest that the CsA induced imbalance bone metabolism is associated with a tendency in increasing the osteoclast number, decreased in the $V_{bo}$ and increased in the osteoclast metabolism. CsA and FK506 can imbalance the bone metabolism at the furcation region in rats, by altering the balance between the number of osteoblasts and osteoclasts, but FK506 unlike CsA is not associated with alveolar bone loss.

**Acknowledgements**

The authors wish to thank the Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes and Eliene A.O.N. Romani from Department of Morfhology of Dental School of Piracicaba (UNICAMP-Brazil) for the kind help with transmission electron microscope. The authors express their gratitude to Ms. José Antônio Zuanon, from Department of Physiology and Pathology of Dental School (UNESP-Araraquara-Brazil), for histological preparation and technical assistance. This research was supported by CNPq and CAPES, Brazil.

**References**

1. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000; **59**: 323-389.

2. Zhao Y, Song M, Guan D, Bi S, Meng J, Li Q, Wang W. Genetic polymorphisms of CPY3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005; **37**: 178-181.

3. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2003; **63**: 1247-1297.

4. Epstein S. Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 1-7.

5. Stempfle HU, Werner C, Siebert U, et al. The role of Tacrolimus (FK506)-based immunosuppression of bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: a prospective, longitudinal, randomized, double-blind trial with calcitriol. *Transplantation* 2002; **73**: 547-552.

6. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; **56**: 23-46.

7. Shane E, Rivas M, McMahon DJ, et al. Bone loss and turnover after cardiac transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1497- 1506.

8. Fu E, Hsieh YD, Mao TK, Shen EC. A histomorphological investigation of the effect of cyclosporin on trabecular bone of the rat mandibular condyle. *Arch Oral Biol* 2001; **46**: 1105-1110.

9. Shen EC, Fu E, Hsieh YD. Effects of Cyclosporin A on dental alveolar bone: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol* **2001**; 72: 659-665.

10. Spolidorio LC, Spolidorio DM, Holzhausen M. Effects of long-term cyclosporin therapy on the periodontium of rats. *J Periodont Res* **2004**; 39: 257-262.

11. Katz IA, Takizawa M, Jofee II, Stein B, Fallon MD, Epstein S. Comparison of the effects of FK506 and Cyclosporine on bone mineral metabolism in the rat. A pilot study. *Transplantation* 1991; **52**: 571-574.

12. Cvetkovik M, Mann GN, Romero DF, Liang XG, Yanfei M, Jee WSS, Epstein S. The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G,

and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation* 1994; **57**: 1231-1237.

13. Inoue T, Kawamura I, Matsuo M, Aketa M, Mabuchi M, Seki J, Goto T. Lesser reduction in bone mineral density by the immunosuppressant, FK506, compared with cyclosporine in rats. *Transplantation* 2000; **70**: 774-779.

14. Goodman GR, Dissanayake IR, Bowman AR, Pun S, Ma Y, Jee WSS, Bryer HP, Epstein S. Transforming growth factor-ß administration modifies cyclosporine-A induced bone loss. *Bone* 2001, **28**: 583-588.

15. Goffin E, Devogelaer JP, Lalaoui A, et al. Tacrolimus and low-dose steroid immunosupression preserves bone mass after renal transplantation. *Transpl Int* 2002; **15**: 73-80.

16. Goffin E, Devogelaer JP, Depresseux G, Squifflet JP, Pirson Y, Van Yperselede de Strihou C. Evaluation of bone mineral density after renal transplantation under a tacrolimus-based immunosuppression: a pilot study. *Clin Nephrol* 2003; **59**: 190-195.

17. Scolapio JS, DeArment J, Hurley DL, Romano M, HarnoisS D, Weigand SD. Influence of tacrolimus and short-duration prednisone on bone mineral density following liver transplantation. *J Parenter Enteral Nutr* 2003; **27**: 427-432.

18. Segal E, Baruch Y, Kramsky R, Raz B, Tamir A, Ish-Shalom S. Predominant factors associated with bone loss in liver transplant patients after prolongated port-transplantation period. *Clin Transplant* 2003; **17**: 13-19.

19. Guichellar MM, Malinchoc M, Sobonga J, Clarke BL, Hay JE. Immunosuppressive and postoperative effects of orthotopic liver transplantation on bone metabolism. *Liver Transpl* 2004; **10**: 638-647.

20. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec* 1989; **224**: 317-324.

21. Quinn JM, Gillespie, MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Commun* 2005; **328**: 739-745.

22. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 1301-1305.

23. Cerri, PS. Osteoblasts engilf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005; **286**: 833-840.

24. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res* 2005; **40:** 287-293.

25. Teitelbaum SL, Ross RP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003; **4**: 638-649.

26. Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 2003; **423**: 343-348.

27. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation on osteoimmunology. *J Mol Med* 2005; **83**: 170-179.

28. Wassef R, Cohen Z, Langer B. Pharmakocinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of rante of administration and dosage. *Transplantation* 1985; **40**: 489-493.

29. Jiang H, Fujitsu T, Sakuma S, et al. Immunosupressive effects of FK 506 on rat renal allograft survival, in comparison with cyclosporine. *Transplant Proc* 1995; **27**: 367-369.

30. Delesse M A. Procedé mécanique pour determiner la composition des roches. *CR Acad Sci* 1848; **25**: 544.

31. Weibel ER. Selection of the best method in stereology. *J Microsc* 1974; **100**: 261-269.

32. Li S, Louis L, Kawaharada N, Yousem S, Pham S. Intrathymic inoculation of donor bone marrow induces long-term acceptance of lung allografts. *Ann Thorac Surg* 2003; **75**: 257-263.

33. Voggenreiter G, Siozoz P, Hunkemöller E, Heute S, Schwarz M, Obertacke U. Immunosuppression with FK506 has no influence on fracture healing in the rat. *Bone* 2005; **37**: 227-233.

34. Muramatsu K, Kurokawa Y, You-Xin S, Bishop A, Doi K. Cell traffic between donor and recipient following rat limb allograft. *Bone* 2005; **23**:181-187.

35. Spolidorio LC, Spolidorio DM, Neves KA, Gonzaga, HF, Almeida OP. Morphological evaluation of combined effects of cyclosporin and nifedipine on gingival overgrowth in rats. *J Periodont Res* 2002; **37**: 192-195.

36. Schlosberg M,Movsowitz C,Epstein S,Ismail F,Fallon MD,Thomas S. The effect of cyclosporin A administration and its withdrawal on bone mineral metabolism in the rat. *Endocrinology* 1989; 124: 2179-2184.

37. Dieperink H, Kemp E, Leyssac PP, Starklint H. Cyclosporin A: effectiveness and toxicity in a rat model. *Clin Nephrol* 1986; **25**: 546.

38. Russel RG, Graveley R, Skjodt H. The effects of cyclosporine A on bone and cartilage. *Br J Rheumatol* 1993; **1**: 42-46.

39. Movsowitz C, Epstein S, Fallon M, Ismail F, Thomas S. Cyclosporin-A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration. *Endocrinology* 1988; **123:** 2571- 2577.

40. Yoshikawa T, Nakajima H, Yamada E, et al. In vivo osteogenic capability of cultured allogenic bone in porous hydroxyapatite: immunosuppressive and osteogenic potential of FK506 *in vivo. J Bone Mine Res* 2000; **15**: 147-1157.

41. Tang L, Ebara S, Kawasaki S, Wakabayashi S, Nikaido T, Takaoka K. FK506 enhanced osteoblastic differentiation in mesenchymal cells. *Cell Biol Int* 2002; **26**: 75-84.

42. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporine A. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 3686-3690.

43. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000; **47**: 119-125.

# Conclusão

Dentro dos limites deste estudo, os dados mostram que o desequilíbrio do metabolismo ósseo induzido pela CsA está associado a uma tendência de aumento do número de osteoclastos, diminuição do volume ósseo e aumento do metabolismo dos osteoclastos. Tanto a CsA quanto o FK506 podem desequilibrar o metabolismo ósseo na região de furca de ratos, através do desequilíbrio do número entre osteoclastos e osteoblastos, mas o FK506 ao contrário da CsA não está associado com perda óssea alveolar.

# REFERÊNCIAS*

ABDELHADI, M.; ERICZON, B.G.; HULTENBY, K.; SJODEN, G.; REINHOLT, F.P.; NORDENSTROM, J. Structural skeletal impairment induced by immunosuppressive therapy in rats: cyclosporine A vs tacrolimus. **Transpl. Int.**, Heidelberg, v. 15, n. 4, p. 180-187, Apr 2002.

ARMSTRONG, V.W.; OELLERICH, M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 34, n. 1, p. 9-16, Feb 2001.

BADER, G.; LEIEUNE, S.; MESSNER, M. Reduction of cyclosporine-induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient. **J. Periodontol.,** Chicago, v. 69, n. 6, p. 729-732, Jun 1998.

BOLTCHI, F.E.; REES, T.D.; IACOPINO, A.M. Cyclosporine-A induced gingival overgrowth: a comprehensive review. **Quintessense Int.**, Berlin, v. 30, n.11, p. 775-783, Nov 1999.

---

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002.24p.

BOUCHTA, N.B.; GHISDAL, L.; ABRAMOWICZ, D.; BROEDERS, N.; SURQUIN, M.; HOANG, A.D.; MARTIN, W.K. Conversion from tacrolimus to cyclosporine is associated with a significant improvement of glucose metabolism in patients with new-onset diabetes mellitus after renal transplantation. **Transplant. Proc.,** New York, v. 37, n. 4, p. 1857-1860, May 2005.

BURROWS, L.; KNIGHT, R.; GENIK, Y.; SCHWARTZ, V.M.; ANAND, R. Conversion to tacrolimus to ameliorate cyclosporine toxicity in kidney recipients. **Transplant. Proc.,** New York , v. 30, n.5, p. 2030-2032, Aug 1998.

CALNE, R.Y.; ROLLES, K.; THIRU, S.; McMASTER, P.; CRADDOCK, G.N.; AZIZ, S.; WHITE, D.G.J.; EVANS, B.D.; RUNN, D.C.; HENDERSON, R.G.; LEWIS, P. Cyclosporin A initially as the only immunossupressant in 34 patientes of cadaveric organs: 32 kidney, 2 pancreases, and 2 liver. **Lancet,** London., v. 2, n. 8151, p. 1033-1036, Nov 1979.

CAYCO, A.V.; WYSOLMERSKI, J.; SIMPSON, C.; MITNICK, M.A.; GUNDBERG, C.; KLIGER, A.; LORBER, M.; SILVER, D.; BASADONNA, G.; FRIEDMAN, A.; INSOGNA, K.; CRUZ, D.; BIA, M. Posttransplant bone disease: evidence for a high bone resorption state. **Transplantation,** Baltimore, v.70, n. 12, p. 1722-1728, Dec 2000.

CHAKRABARTI, P.; WONG, H.Y.; SCANTLEBURY, V.P.; JORDAN, M.L.; ELLIS, D.; LOMBARDOZZI-LANE, S.; HAKALA, T.R.; FUNG, J.J.; SIMMONS, R.L.; STARZL, T.E.; SHAPIRO, R. Outcome after steroid withdrawl in pediatric renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression**. Transplantation**, Baltimore, v. 70, n. 5, p. 760-764, Sep 2000.

CUETO-MANZANO, A.M.; KONEL, S.; HITCHINSON, A.J.; CROWLEY, V.; FRANCE, M.W.; FREEMONT, A.J.; ADAMS, J.E.; MAWER, B.; GOKAL, R. Bone loss in long-term renal transplantation: histopathology and densitometry analysis. **Kidney Int.,** New York, v. 55, n. 5, p. 2021-2029, May 1999.

CVETKOVIC, M.; MANN, G.N.; ROMERO, D.F.; LIANG, X.G.; YANFEI, M.; JEE, W.S.S.; EPSTEIN, S. The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. **Transplantation,** Baltimore, v. 57, n. 8, p. 1231-1237, Apr 1994.

DALEY, T.D.; WYSOCKI, G.P. Cyclosporin therapy. Its significance to the periodontist. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 55, n. 12, p. 708-712, Dec 1984.

DERFUS, B.A.; CSUKA, M.E.; CARRERA, G.F.; HANSON, G.A.; SMITH, R.E. Bone remodeling after growth factor and cyclosporine A therapy for aplastic anemia. **J. Rheumatol.,** Toronto, v. 18, n.5, p. 738-742, May 1991.

DUNN, S.P. Neoral monitoring 2 hours post-dose and the pediatric transplant patient. **Pediatr. Transplant.,** Copenhagen, v. 7, n. 1, p. 25-30, Feb 2003.

ECKSTEIN, L.A.; VAN QUILL, K.R.; BUI, S.K.; UUSITALO, M.S.; O'BRIEN, J.M. Cyclosporin a inhibits calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling and induces apoptosis in retinoblastoma cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, St. Louis, v. 46, n. 3, p. 782-790, Mar 2005.

EKELUND, A.L.; NILSSON, O. Effects of Cyclosporin A on bone turnover and resorption of demineralized bone matrix. **Clin. Orthop.,** Philadelphia, v. 326, p. 127-134, May 1996.

EPSTEIN, S. Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. **J. Bone Miner. Res.,** New York, v. 11, n. 1, p. 1-7, jan.1996.

EPSTEIN, S.; SCHLOSBERG, M.; FALLON, M.; THOMAS, S.; MOVSOWITZ, C.; ISMAIL, F. 1, 25 dihidroxivitamin D3 modifies cyclosporine-induced bone loss. **Calcif. Tissue Int.,** Berlin, v. 47, n. 3, p. 152-157, May 1990.

ERBEN, R.G.; STANGASSINGER, M.; GARTNER, R. Skletal effects of low-dose cyclosporin-A in aged male rats: lack of relationship to serum testosterone levels. **J. Bone Miner. Res.,** New York, v. 13, n. 1, p. 79-97, Jan 1998.

EZAITOUNI, F.; WESTEEL, P.F.; FARDELLONE, P.; MAZOUZ, H.; BRAZIER, M.; EL ESPER, I.; SEBERT, J.L.; PETIT, J.; WESTEEL, A.; PRUNA, A.; FOURNIER, A. Long-term stability of bone mineral density in patients with renal transplant treated with cyclosporine and low doses of corticoids. Protective role of cyclosporine? **Presse Med.,** Paris, v. 27, n. 15, p. 705-712, Apr 1998.

FIORE, C.E.; PENNISI, P.; CUTULI, V.M.; PRATO, A.; MESSINA, R.; CLEMENTI, G. L-arginine prevents bone loss and bone collagen breakdown in cyclosporine-A treated rats. **Eur. J. Pharmacol.,** Amsterdam, v. 408, n.3, p. 323-326, Nov 2000.

FOXWELL, B.M.; WOERLY, G.; RYFFEL, B. Inhibition of interleukin 4 receptor expression on human lymphoid cells by cyclosporin. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 20, n. 5, p.1185-6, May 1990.

FRUMAN, D.A.; KLEE, C.B.; BIERER, B.E.; BURAKOFF, S.J. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes in inhibited by FK506 and Cyclosporin A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 89, n. 9, p. 3686-3690, May 1992.

FU, E.; HSIEH, Y.D.; NIEH, S.; WIKESJO, U.M.E; LIU, D. Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. **J. Periodontol.,** Chicago, v. 70, n. 2, p. 189-194, Feb 1999.

FU, E.; HSIEH, Y.D.; MAO, T.K.; SHEN, E.C. A histomorphological investigation of the effect of cyclosporin on trabecular bone of the rat mandibular condyle. **Arch. Oral Biol.,** Oxford, v. 46, n. 12, p. 1105-1110, Dec 2001.

FUKUNAGA, J.; YAMAAI, T.; YAMACHIKA, E.; ISHIWARI, Y.; TSUJIGIWA, H.; SAWLEE, Y.J.; UENO, T.; KIRINO, S.; MIZUKAWA, N.; NAGAI, N.; SUGAHARA, Y. Expression of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in rat osteoporosis induce immunosuppressant FK506. **Bone,** Elmsford, v. 34, n. 3, p. 425-431, Mar 2004.

GARCIA, S.C.; LOPES, L.S.; SCHOTT, K.L.; BECK, S.T.; POMBLUM, V.J. Ciclosporina A e Tacrolimus: uma revisão. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, n. 6, p. 393-401, Dez 2004.

GOFFIN, E.; DEVOGELAER, J.P.; DEPRESSEUX, G.; SQUIFFLET, J.P.; PIRSON, Y.; Van YPERSELEDE de STRIHOU, C. Evaluation of bone mineral density after renal transplantation under a tacrolimus-based immunosuppression: a pilot study. **Clin. Nephrol.,** München-Deisenhofen, v. 59, n. 3, p. 190-195, Mar 2003.

GOFFIN, E.; DEVOGELAER, J.P.; LALAOUI, A.; DEPRESSEUX, G.; NAEYER, P.; SQUIFFLET, J.P.; PIRSON, Y.; Van YPERSELEDE de STRIHOU, C. Tacrolimus and low-dose steroid immunosupression preserves bone mass after renal transplantation. **Transpl. Int.**, Heidelberg, v. 15, n.2-3, p. 73-80, Mar 2002.

GOODMAN, G.R.; DISSANAYAKE, I.R.; BOWMAN, A.R.; PUN, S.; MA, Y.; JEE, W.S.S.; BRYER, H.P.; EPSTEIN, S. Transforming growth factor-ß administration modifies cyclosporine-A induced bone loss. **Bone**, Elmsford, v. 28, n. 6, p. 583-588, Jun 2001.

GROTZ, W.H.; MUNDINGER, F.A.; RASENACK, J.; SPEIDEL, L.; OLSCHEWSKI, M.; EXNER, V.M.; SCHOLLMEYER, P.J. Bone loss after kidney transplantation: a longitudinal study in 115 graft recipients. **Nephrol. Dial. Transplant.,** Berlin ; New York, v. 10, n. 11, p. 2096-2100, Nov 1995.

GUERCKI, J.; WARTY, V.; SANGHI, A. The transport of cyclosporine in association with plasma lipoproteins in heart and liver transplant patients.**Transplant. Proc.,** New York , v. 17, n.4, p. 1997-2002, Aug 1985.

GUICHELAAR, M.M.; MALINCHOC, M.; SOBONGA, J.; CLARKE, B.L.; HAY, J.E. Immunosuppressive and postoperative effects of orthotopic liver

transplantation on bone metabolism. **Liver Transpl.,** Philadelphia, v. 10, n. 5, p. 638-647, May 2004.

HIGGINS, R.M.; HART, P.; LAM, F.T.; KASHI, H. Conversion from tacrolimus to cyclosporine in stable renal transplant patients: safety, metabolic changes end farmacokinetic comparison. **Transplantation,** Baltimore, v. 70, n. 1, p. 199-202, Jul 2000.

HOFBAUER, L.C.; HEUFELDER, A.E. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases**. J. Clin. Endocrinol. Metab.,** Springfield, v. 85, n. 7, p. 2355-2363, Jul 2000.

HOHAGE, H.; HILLEBRANDT, U.; WELLING, U.; ZEH, M.; HECK, M.; GERHARDT, U.W.; SUWELACK, B.M. Cyclosporine and tacrolimus: influence on cardiovascular risk factors. **Transplant. Proc.,** New York, v. 37, n. 2, p. 1036-1038, Mar 2005.

INOUE, T.; KAWAMURA, I.; MATSUO, M.; AKETA, M.; MABUCHI, M.; SEKI, J.; GOTO, T. Lesser reduction in bone mineral density by the immunosuppressant, FK506, compared with cyclosporine in rats. **Transplantation,** Baltimore, v. 70, n. 5, p. 774-779, Sep 2000.

JAMES, J.A.; BOOMER, S.; MAXWELL, A.P.; HULL, P.S.; SHORT, C.D.; CAMPBELL, B.A.; JOHNSON, R.W.; IRWIN, C.R.; MARLEY, J.J.; SPRATT, H.; LINDEN, G.J. Reduction in gingival overgrowth associated with conversion from cyclosporin A to tacrolimus. **J. Clin. Periodontol.,** Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 144-148, Feb 2000.

JIANG, H; FUJITSU, T.; SAKUMA, S.; OGAWA, T.; TAAMURA, K.; FUJII, Y.; AKIYAMA, Y.; IZUMI, S.; TAKAHARA, S.; ISHIBASHI, M. Immunosupressive effects of FK 506 on rat renal allograft survival, in comparison with cyclosporine. **Transplant. Proc.**, New York, v. 27, n. 2, p. 367, Feb 1995.

KAWANA, K.; TAKAHASHI, M.; KUSHIDA, K.; HOSHINO, H.; SAKATA, S.; INOUE, T. The effects of cyclosporin A administration on bone metabolism in the rat evaluated by biochemical markers. **J. Endocrinol. Invest.,** Milano, v. 19, n. 8, p. 499-504, Sep 1996.

KEOWN, P.A.; LAUPACIS, A.; CARRUTHERS, G. The effects and side effects of cyclosporine: relashionship to drug pharmacokinetics. **Transplant. Proc.**, New York, v. 14, n. 4, p. 659-664, Dec 1992.

KLAUSHOFER, K.; HOFFMAN, O.; STEWART, P.J.; CZERWENKA, E.; KOLLER, K.; PETERLIK, M.; STERN, P.H. Cyclosporine A inhibits bone

resorption in cultured neonatal mouse calvaria. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** Baltimore, v. 243, n. 2, p.584-590, Nov 1987.

KOVARIK, B.K.; HOYER, P.F.; ETTENGER, R.; PUNCH, J.; SOERGEL, M. Cyclosporine absorption profiles in pediatric kidney and liver transplant patients. **Pediatr. Nephrol.,** Berlin, v. 18, n. 12, p. 1275-1279, Dec 2003.

KRAMER, B.K.; KRUGER, B.; MACK, M.; OBED, A.; BANAS, B.; PACZEK, L.; SCHLITT, H.J. Steroid withdrawl or steroid avoidance in renal transplant recipients: focus on tacrolimus-based immunosuppressive regimens. **Transplant. Proc.,** New York, v. 37, n. 4 p. 1789-1791, May 2005.

MATL, I.; VIKLICKY, O.; VOSKA, L.; LODERÉROVA, A.; VITKO, S. The effect of different immunosuppressive regimens on TGF-ß1 expression in kidney transplant patients. **Transpl. Int.,** Heidelberg, v. 18, n. 6, p. 668-671, Jun 2005.

MAURER, G.; URAYAMA, A.; KOGURE, M. Double mask trial of cyclosporine versus colchicines and long-term open study of cyclosporine in Behcet's diseases. **Lancet**, London, v. 1, n.8647, p. 1093, May 1985.

McCAULEY, L.K.; ROSOL, T.J.; CAPEN, C.C. Effects of cyclosporin A on rat osteoblast (ROS 17/2.8 cells) in vitro. **Calcif. Tissue Int.,** Berlin, v. 51, n. 4, p. 291-297, Oct 1992.

MONEGAL, A.; NAVASA, M.; GUANABENS, N.; PERIS, P.; PONS, F.; MARTINEZ de OSABA, M.J.; RIMOLA, A.; RODES, J.; MUNOZ-GOMEZ, J. Bone mass and mineral metabolism in liver transplant patients treated with FK506 or cyclosporine A. **Calcif. Tissue Int.**, Berlin, v. 68, n. 2, p. 83-86, Feb 2001.

MOSER, M.A. Options for induction immunossuppression in liver transplant recipients. **Drugs**, New York, v. 62, n. 7, p. 995-1011, 2002.

MOVSOWITZ, C.; EPSTEIN, S.; FALLON, M.; ISMAIL, F.; THOMAS, S. Cyclosporin A in vivo produces severe osteopenia in the rats: effect of dose and duration of administration. **Endocrinology,** Springfield, v. 123, n.5, p. 2571-2577, Nov 1988.

NASSAR, C.A.; NASSAR, P.O.; ANDIA, D.C.; GUIMARÃES, M.R.; SPOLIDORIO, L.C. Effects of long term FK506 therapy in glicemic levels of rat – biochemical estimation. **Transplant. Proc.**, New York, 2006 (in press).

OETTINGER-BARAK, O.; BARAK, S.; MACHTEI, E.E.; ARDEKIAN, L.; BARUCH, Y.; PELED, M. Periodontal changes in liver cirrhosis and post-transplantation patients. I: Clinical findings. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 72, n.3, p. 1236-1240, Sep 2001.

OTT, R.; BUSSENIUS-KAMMERER, M.; KOCH, C.A.; YEDIBELA, S; KISSLER, H.; HOHENBERGER, W.; MULLER, V. Does conversion of immunosuppressive monotherapy from cyclosporine a to tacrolimus improve bone mineral density in long-term stable liver transplant recipients? **Transplant. Proc.**, New York, v. 35, n. 8, p. 3032-3034, Dec 2003.

PLOSKER, G.L.; FOSTER, R.H. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. **Drugs**, New York, v. 59, n. 2, p. 323-89, Feb 2000.

RHO, J.; TAKAMI, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: interactions of the immune skeletal systems. **Mol. Cells,** Seoul, v. 17, n. 1, p. 1-9, Feb 2004.

ROMERO, D.F.; BUCHINSKY, F.J.; RUCINSKI, B.; CVETKOVIC, M.; BRYER, H.P.; LIANG, X.G.; MA, Y.F.; JEE, W.S.; EPSTEIN, S. Rapamycin: a bone sparing immunosuppressant? **J. Bone. Miner. Res.,** New York, v. 10, n. 5, p. 760-768, May 1995.

SANCHEZ, A.R.; SHERIDAN, P.J.; ROGERS, R.S. Successfull treatment of oral lichen planus-like chronic graft-versus-host disease with topical tacrolimus: a case report. **J. Periodontol.,** Chicago, v. 75, n. 4, p. 613-619, Apr 2004.

SASAGAWA, K.; FUJIBAYASHI, S.; OKANO, K.; NAWA, C.; SUZUKI, S.; KOU, S.; YAMADA, Y.; SOMEYA, K. Different inhibitory actions of immunomodulating agents and immunosuppressive agents on bone resorption of mouse calvaria. **Int. J. Immunopharmacol.,** Oxford, v. 11, n. 8, p. 953-959, 1989.

SASS, D.A.; RUCINSKI, B.; BRYER, H.P.; MANN, G.N.; YUAN, Z.; MA, Y.; JEE, W.S.; EPSTEIN, S. Combined flurbiprofen and cyclosporine-A does not attenuate bone loss and exaggerates renal impairment. **Bone,** Elmsford, v. 19, n. 4, p. 381-386, Oct 1996.

SCHLOSBERG, M.; MOVSWITZ, C.; EPSTEIN, S.; ISMAIL, F.; FALLON, M.; THOMAS, S. The effect of cyclosporine A administration and it is withdrawal on bone mineral metabolism in the rats. **Endocrinology,** Springfield, v. 124, n.5, p. 2179-2184, May 1989.

SCOLAPIO, J.S.; DeARMENT, J.; HURLEY, D.L.; ROMANO, M.; HARNOIS, D.; WEIGAND, S.D. Influence of tacrolimus and short-duration prednisone on bone mineral density following liver transplantation. **J. Parenter. Enteral Nutr.,** Thorofare, v. 27, n. 6, p. 427-432, Nov/Dec 2003.

SCOTT, L.J.; McKEAGE, K.; KEAM, S.J.; PLOSKER, G.L. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. **Drugs**, New York, v. 63, n. 12, p. 1247-1297, 2003.

SEGAL, E.; BARUCH, Y.; KRAMSKY, R.; RAZ, B.; TAMIR, A.; ISH-SHALOM, S. Predominant factors associated with bone loss in liver transplant patients after prolongated port-transplantation period. **Clin. Transplant.,** Copenhagen, v. 17, n. 1, p. 13-19, Feb 2003.

SELZNER, N.; DURAND, F.; BERNUAU, J.; HENEGHAN, M.A.; TUTLE-NEWHALL, J.E.; BELGHITI, J.; CLAVIEN, P.A. Conversion from cyclosporine do FK506 in adult liver transplant recipients: a combined North American e European experience. **Transplantation,** Baltimore, v. 72, n. 6, p. 1061-1065, Sep 2001.

SHANE, E.; RIVAS, M.; McMAHON, D.J.; STARON, R.B.; SILVERBERG, S.J.; SEIBEL, M.J.; MANCINI, D.; MICHLER, R.E.; AARONSON, K.; ADDESSO, V.; LO, S.H. Bone loss and turnover after cardiac transplantation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** London, v. 82, n.5, p. 1497-1506, May 1997.

SHEN, E.C.; FU, E.; HSIEH, Y.D. Effects of Cyclosporin A on dental alveolar bone: A histomorphometric study in rats. **J. Periodontol.,** Chicago, v. 72, n. 5, p. 659-665, May 2001.

SMALLWOOD, G.A.; BURNS, D.; FASOLA, C.G.; STEIBER, A.C.; HEFFRON, T.G. Relashionship between imminosuppression and osteoporosis in an outpatient liver transplant clinic. **Transplant. Proc.,** New York, v. 37, n. 4, p. 1910-1911, May 2005.

SPOLIDORIO, L.C. **Avaliação morfométrica e/ou estereométrica da gengiva marginal, processo alveolar e cemento de ratos tratados com ciclosporina**. 2003. 215f. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.; NASSAR, P.O.; NASSAR, C. A.; HOLZHAUSEN, M.; ALMEIDA, O.P**.** Influence of age on combined effects of cyclosporin and nifedipine on rat alveolar bone**. J. Periodontol.,** Chicago, v. 75, n.2, p. 268-272, Feb 2004.

STEMPFLE, H.U.; WERNER, C.; SIEBERT, U.; ASSUM, T.; WEHR, U.; RAMBECK, W.A.; MEISER, B.; THEISEN, K.; GARTNER, R. The role of tacrolimus (FK506) (FK 506)-based immunosuppression on bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: a prospective, longitudinal, randomized, double-bind trial with calcitriol. **Transplantation**, Baltimore, v. 73, n. 4, p. 547-552, Feb 2002.

STEWART, P.J.; STERN, P.H. Cyclosporines: correlation on immunosuppressive activity and inhibition on bone resorption. **Calcif. Tissue Int.,** Berlin, v. 45, n. 4, p. 222-226, Oct 1989.

STEWART, P.J.; GREEN, O.C.; STERN, P.H. Cyclosporin A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption in vitro. **J. Bone Miner. Res.,** New York, v. 1, n.3, p. 285-291, Jun 1986.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J. Periodont. Res.,** Copenhagen, v. 40, n. 4, p. 287-293, Aug 2005.

TAKAYANAGI, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation on osteoimmunology. **J. Mol. Med.**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 170-179, Mar 2005.

TAYLOR, A.L.; WATSON, C.J.E.; BRADLEY, J.A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.,** Boca Raton, v. 56, n. 1, p. 23-46, Oct 2005.

THIEBAUD, D.; KRIEG, M.A.; GILLARD-BERGER, D.; JACQUET, A.F.; GOY, J.J.;BURCKHARDT, P. Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. **Eur. J. Clin. Invest.,** Berlin, v. 26, n. 7, p. 549-555, Jul 1996.

TORRES, A.; GARCIA, S.; BARRIOS, Y.; HERNANDEZ, D.; LORENZO, V. Bone metabolism alterations after kidney transplantation. **Nefrologia,** Madrid, v. 23, supl. 2, p. 122-126, 2003.

VENKATARAMANAN, R.; SWAMINATHAN, A.; PRASAD, T.; JAIN, A.; ZUCKERMAN, S.; WARTY, V.; McMICHAEL, J.; LEVER, J.; BURCKART, G.; STARZL, T. Clinical pharmacokinetics of Tacrolimus. **Clin. Pharmacokinet.,** New York, v. 29, n. 6, p. 404-430, Dec 1995.

VICENTI, F.; TUNCER, M.; CASTAGNETO, M.; KLINGER, M.; FRIMAN, S.; SCHEUERMANN, E.H.; WIECEK, A.; RUSS, G.R.; MARTINEK, A.; NONNAST-DANIEL, B. Prospective, multicenter, randomized trial to compare incidence of new-onset diabetes mellitus and glucose metabolism in patients receiving cyclosporine microemulsion versus tacrolimus after de novo kidney transplantation. **Transplant. Proc.,** New York, v. 37, n. 2, p. 1001-1004, Mar 2005.

VOGGENREITER, G.; ASSENMACHER, S.; KREUZFELDER, E.; WOLF, M.; KIM, M.; NAST-KOLB, D.; SCHADE, F.U. Immunosuppression with FK506 increases bone induction in demineralized isogenic and xenogeneic bone matrix in the rat. **J. Bone Min. Res.,** New York, v. 15, n. 9, p. 1825-1834, Sep 2000.

WASSEF, R.; COHEN, Z.; LANGER, B. Pharmakocinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of rante of administration and dosage. **Transplantation**, Hagerstown, v. 40, n.5, p. 489-93, Nov 1985.

WITHOLD, W.; WOLF, H.H.; KOLLBACH, S.; HEYLL, A.; SCHNEIDER, W.; REINAUER, H. Monitoring of bone metabolism after bone marrow transplantation by measuring two different markers of bone turnover. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.,** Berlin, v. 34, n. 3, p. 193-197, Mar 1996.

YAMADA, T.; MOGI, M.; KAGE, T. Enhancement by cyclosporin A of metastasis from hamster cheek pouch carcinoma. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, n.7, p. 593-596, 1992.

ZHAO, Y.; SONG, M.; GUAN, D.; BI, S.; MENG, J.; LI, Q.; WANG, W. Genetic polymorphisms of CPY3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. **Transplant. Proc.,** New York, v. 37, n. 1, p. 178-181, Jan/Feb 2005.

ANDIA, D.C. **Características morfológicas do osso alveolar de ratos tratados com ciclosporina-a ou tacrolimus.** 2006. 124f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

## Resumo

Ciclosporina-A e Tacrolimus (FK506) são os imunossupressores mais comumente usados para reduzir a rejeição de transplantes de órgãos sólidos. Uma freqüente complicação relatada em pacientes após o transplante de órgãos, é o desenvolvimento de osteopenia. Assim, tem sido sugerido que a terapia imunossupressora pode ser um fator importante no desenvolvimento da doença óssea pós-transplante. Osteoblastos e osteoclastos são as células reguladoras do metabolismo ósseo e estão sob a influência de fatores sistêmicos e locais. O objetivo deste estudo foi descrever e comparar a histometria, estereometria do osso alveolar e a ultraestrutura dos osteoblastos e osteoclastos de ratos tratados com injeção subcutânea diária de CsA (10mg/kg peso corporal), FK506 (1mg/kg peso corporal) ou NaCl (0.9%) (grupo controle), por 60 dias. Ao final do período experimental, os ratos foram sacrificados e após o processamento histológico, os parâmetros estereométricos: número de osteoclastos e osteoblastos/mm, de superfície óssea, volume do osso alveolar ($V_{bo}$), volume do espaço medular ($V_m$) e outras estruturas ($V_o$) (ligamento peridontal, dentina e cemento) na região de furca do primeiro molar superior, assim como os parâmetros histométricos: distância linear da superfície óssea alveolar de uma região apical à outra e os parâmetros

ultraestruturais dos osteoclastos e osteoblastos foram analisados. Os resultados confirmaram que a CsA causa uma perda óssea alveolar mais severa que o FK506. A terapia com CsA diminuiu o número de osteoblastos/mm e $V_{bo}$ e promoveu uma tendência do aumento do número de osteoclastos/mm de superfície óssea. Não houve diferença entre os ratos tratados com FK506 e os ratos controle. No entanto, a terapia sistêmica com FK506 induziu a uma diminuição do número de osteoclastos/mm de superfície óssea. A superfície do osso alveolar de ratos tratados com CsA apresentou numerosas excavações profundas associadas com osteoclastos multinucleados. Os osteoclastos apresentavam borda em escova típica, numerosas mitocôndrias e vacúolos na sua porção adjacente à superfície óssea. Ocasionalmente, as profundas excavações continham alguns osteoblastos que pareciam estar produzindo uma matriz extracelular rica em colágeno na superfície óssea previamente reabsorvida. Por outro lado, os ratos tratados com FK506 apresentavam uma camada contínua de osteoblastos ativos com retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. Os escassos osteoclastos multinucleados pareciam estar desprendidos da lacuna óssea previamente reabsorvida. As superfícies ósseas escavadas encontravam-se freqüentemente preenchidas por osteoblastos ativos e matriz rica em colágeno. Os dados indicam que, aos 60 dias, o desequilíbrio do metabolismo ósseo induzido pela CsA está associado com a diminuição do volume ósseo, tendência de aumento do número de osteoclastos e aumento do metabolismo dos osteoclastos. CsA e FK506 podem desequilibrar o metabolismo ósseo na região de furca de ratos, através do

desequilíbrio entre o número de osteoblastos e osteoclastos, mas o FK506, ao contrário da CsA, não está associado com perda óssea alveolar.

ANDIA, D.C. **Características morfológicas do osso alveolar de ratos tratados com ciclosporina-a ou tacrolimus.** 2006. 124f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

## Abstract

Cyclosporine-A (CsA) and Tacrolimus (FK506) are the most commonly used immunosuppressants to reduce the rejection of allogenic organ transplants. A frequent complication reported in patients following organ transplantation is the development of osteopenia and it has been suggested that immunosuppressive therapy may be an important factor in the development of post-transplant bone disease. Osteoblasts and osteoclasts are the regulators of bone metabolism and are under influence by local microenviroment and components of the immune system. The purpose of this study was to describe and to compare the histometry, stereometry of the alveolar bone and the ultrastructure of osteoblasts and osteoclasts of rats treated with a daily subcutaneous injection of CsA (10mg/kgbody weight), FK506 (1mg/kgbody weight) or NaCl (0.9%) (control group), for 60 days. At the end of the experimental period, rats were sacrificed and after histological processing, stereometric parameters: number of multinucleated osteoclasts/mm, number of osteoblasts/mm, volume of the alveolar bone ($V_{bo}$), volume of the marrow ($V_m$) and other structures ($V_o$) (periodontal ligament, dentin and cementum) at the furcation region of the first upper molar as well as histometric parameters: linear distance of the alveolar bone surface to one

apical region to another one and ultrastructural parameters of osteoclasts and osteoblasts were analysed. The results confirmed that CsA causes a more severe alveolar bone loss than FK506. The therapy with CsA decreased number of osteoblasts/mm and $V_{bo}$ and increased number of multinucleated osteoclasts/mm and $V_{m.}$ There was not difference between FK506- treated rats and control rats. However, the systemic therapy with FK506 induced the decreased of number of multinucleated osteoclasts/mm. The surface of the alveolar bone of the CsA treated rats showed numerous deep excavations associated with multinucleated osteoclasts. The osteoclasts showed typical ruffled border, abundant mitochondria and vacuoles were closely apposed to irregular surfaces of the bone. Occasionally, the deep excavations contained some osteoblasts that appeared to be producing an extracellular matrix rich in collagen on the previously resorbed bone surface. On the other hand, the FK506-treated rats showed a continuous layer of active osteoblasts with a well-developed rough endoplasmatic reticulum. Few multinucleated osteoclasts appeared to be detaching from the previously resorbed bone lacuna. The excavated bone surfaces were often filled by active osteoblasts and a rich-collagen matrix. The data indicate that, at 60 days, the imbalance of the bone metabolism induced by CsA is associated with a tendency in increasing the osteoclast number, decrease of the $V_{bo}$ and the increase of the osteoclast metabolism. CsA and FK506 can imbalance the bone metabolism at the furcation region in rats, by altering the balance between the number of osteoblasts and osteoclasts, but the FK506 unlike CsA is not associated with alveolar bone loss.

**ANEXO**

Carta de aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Características morfométricas e ultraestruturais do periodonto de ratos tratados com FK506 ou Ciclosporina-A” pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Processo CEEA n.16/2004.

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Araraquara, 04 de outubro de 2004

Ofício CEEA-FO/Ar. nº 060/2004

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, reunido em 27/09/2004, após a avaliação final do projeto de sua responsabilidade intitulado "Características morfométricas e ultraestruturais do periodonto de ratos tratados com FK-506 ou ciclosporina-A" (Proc. CEEA nr. 16/2004) considerou-o **APROVADO**, devendo o **relatório final** ser apresentado em **FEVEREIRO/2006.**

Atenciosamente.

***Profa. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira***
*Coordenadora do CEEA*

À
**C.D. DENISE CARLETO ANDIA**
OD. Pesquisador Responsável
Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho.

Araraquara, 20/01/2006.

Denise Carleto Andia.