



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



PATRICIA OEHLMEYER NASSAR

**Avaliação do efeito da Sinvastatina em ratos
submetidos a periodontite experimental e
imunossuprimidos por Ciclosporina-A e
Tacrolimus**

ARARAQUARA
2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



PATRICIA OEHLMEYER NASSAR

**Avaliação do efeito da Sinvastatina em ratos
submetidos a periodontite experimental e
imunossuprimidos por Ciclosporina-A e
Tacrolimus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para a
obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscara

ARARAQUARA
2008

Nassar, Patrícia Oehlmeyer.

Avaliação do efeito da Sinvastatina em ratos submetidos a periodontite experimental e imunossuprimidos por Ciclosporina-A e Tacrolimus / Patrícia Oehlmeyer Nassar. – Araraquara: [s.n.], 2008.

115 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscara

1. Tacrolimo 2. Doenças periodontais 3. Ciclosporina
4. Sinvastatina 5. Osso e ossos. I. Título

PATRICIA OEHLMEYER NASSAR

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA EM RATOS SUBMETIDOS A
PERIODONTITE EXPERIMENTAL E IMUNOSSUPRIMIDOS POR
CICLOSPORINA-A E TACROLIMUS.

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

2º Examinador: Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur

3º Examinador: Profa. Dra. Sandra Lucinei Balbo

4º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

5º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 27 de março de 2008.

DADOS CURRICULARES**PATRICIA OEHLMEYER NASSAR**

NASCIMENTO	31.01.1974 – RIO CLARO/SP
FILIAÇÃO	Valdemir Oehlmeyer Rosemarí Ap. Teixeira Leite Oehlmeyer
1995-1998	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2002 - 2003	Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2002 – 2005	Professor Auxiliar da Disciplina de Periodontia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.
2004 – 2008	Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2007 – 2008	Professor Assistente da Disciplina de Periodontia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

...A DEUS

"pela certeza de que para todos os acontecimentos da vida, bons ou ruins, existe uma razão norteada pela justiça divina."

...AO MEU MARIDO CARLOS,

pela dedicação, luta, determinação, amor e paciência para que todos os meus sonhos se realizassem. Acima de tudo, eterno " Mestre " e companheiro, incansável amigo e colaborador, o meu verdadeiro amor. O grande responsável por esta conquista e por todas da minha vida.

...AOS MEUS PAIS VALDEMIR E ROSEMARÍ,

exemplos de união, coragem, luta, renúncia, fé,
carinho e dedicação, incondicionais a seus
filhos... Os verdadeiros exemplos de vida.

***...AOS MEUS IRMÃOS E CUNHADOS: RENATO E
GABRIELA, NATÁLIA E RODRIGO; E JUNINHO,***

meus melhores amigos, verdadeiros em tudo o
que fazem. Pela força, atenção, compreensão e
apoio dados durante todo este período,
principalmente pelo amor e carinho em todos os
momentos.

***...AOS MEUS SOBRINHOS: GIOVANNA, VINÍCIUS
HENRIQUE, GUILHERME E LEONARDO,***

Pelas brincadeiras e momentos de alegria que mantiveram meu espírito criança capaz de esquecer os problemas e enxergar as dificuldades com simplicidade.

***...AOS MEUS SOGROS JORGE E EMILIA E AOS
MEUS CUNHADOS: VALÉRIA, PATRICIA, JORGE E
MARISTELA, SUMAIRA E GUILHERME.***

pelo constante apoio, carinho e amizade. Exemplos de vida e de seres humanos.

...AO PROF. DR. LUÍS CARLOS SPOLIDORIO,

não só o orientador e professor, mas acima de tudo um grande amigo. Agradeço pela atenção a esta tese e principalmente por tudo que nos fez durante toda esta longa caminhada desde o mestrado. Que Deus lhe proteja e ilumine nesta caminhada de sucesso.

...AO PROF. DR. CARLOS ROSSA JR,

pela amizade, confiança e apoio. Espero poder retribuir-lhe tudo o que fez enquanto orientador, que Deus continue protegendo e iluminando você nesta brilhante caminhada...

***...ÀS MINHAS INCANSÁVEIS AMIGAS MORGANA
E SABRINA,***

pela amizade, carinho e dedicação. Graças a vocês, o sonho de realizar um trabalho que parecia impossível se tornou realidade. Desejo a vocês todo o sucesso do mundo e que Deus continue protegendo e iluminando vocês nesta brilhante caminhada...

AGRADECIMENTOS

Minha sincera gratidão aos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

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

À coordenadora do Curso de Pós-Graduação - Área de Periodontia, Profa. Dra. Silvana Regina Peres Orrico, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela excelente formação, dedicação e exemplo.

Aos amigos e Docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci

Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior e Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, pela formação e orientação.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, em especial Andréa, Beatriz, Daniela, Fernanda, Fernando, Ishi, Ivi, Juliana Moraes, Juliana Rico, Maurício e Vanessa, pelos momentos de descontração, companheirismo e caráter; estejam certas de que tais atitudes jamais serão esquecidas.

Aa Cacá, Morgana, Denise, Sabrina, Rafaela e Fábio pelo apoio, ajuda, cooperação, compreensão, amizade e dedicação na realização deste trabalho, podem contar sempre com a minha eterna gratidão e amizade.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, Claudia, D. Maria do Rosário, D. Teresinha, Maria José, Thelma, Sueli e Toninho, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitou a realização deste trabalho.

À Regina Lúcia, pela cooperação e paciência e acima de tudo à competência no trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia, em especial, Profa. Denise, Profa. Rita, Prof. Beto e Prof. Tato; e em especial também ao José Antonio pela oportunidade, disponibilidade e ajuda.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscara, meu co-orientador, mesmo distante, sempre estava disponível a ajudar e participar deste trabalho.

À Profa. Regina e ao Prof. Iguatemi pela disponibilidade e ajuda na Faculdade de Farmácia, e em especial aos funcionários Marcos e Valéria, do Laboratório de Bioquímica, pela ajuda e disposição.

Aos funcionários do Biotério, Donizeti e Betinha, pelo cuidado e atenção dedicados aos ratos do experimento.

Ao CNPq, A FAPESP e a CAPES, que possibilitaram a ajuda financeira.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Mara, Rosângela, Alexandre, pela paciência, competência e cooperação no decorrer de todo o Curso.

A todos os funcionários da Faculdade, em especial aos funcionários da Biblioteca, Adriano, Ceres, Eliane, Eliane Scarso, Maria Aparecida, Maria Helena, Maria Inês, Maria José, Marley, Odete, Sandra e Silvia pela colaboração e paciência.

A todos os meus amigos sempre presentes nesta minha caminhada: Ju Moraes, Ivi, Ju Rico, Andréa, Bia, Morgana, Sabrina, Rafaela e Dani Zandin pela convivência, festas, brincadeiras, apoio e sonhos compartilhados.

Ao Curso de Odontologia de Cascavel da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE,

nas pessoas do Digníssimo Reitor, Alcebíades Luiz Orlando e do Coordenador do Curso Prof. Alexandre Almeida Webber, pelo apoio e compreensão dispensados para a realização deste Curso.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da UNIOESTE, Prof. Carlos e Profa. Adriane, pela cooperação, ajuda e compreensão.

Aos professores e amigos de Cascavel, Adriano e Suzana, Christian, Edo e Fran, Roberto e Juliana, Julio e Sandra, Tanaka, Neto, Veridiana, Daniela e Ricardo, Gaúcho pela convivência, festas, apoio e amizade nesta longa e difícil caminhada...

MUITO OBRIGADO!!!!

HOMENAGEM

"Aos animais que participaram desta pesquisa, que silenciosamente se deixaram levar pelas mãos do Homem. As mesmas mãos que os afagaram e os sacrificaram. Sabiam do destino desde o início, pois seus olhos não enganam, mas mesmo assim tiveram a coragem de servir à ciência. Ficam aqui os meus sinceros agradecimentos aos dóceis e amáveis ratos....."

SUMÁRIO

<i>Resumo</i> -----	20
<i>Abstract</i> -----	23
<i>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</i> -----	26
<i>2 PROPOSIÇÃO</i> -----	33
<i>3 MATERIAL E MÉTODO</i> -----	35
<i>4 RESULTADO</i> -----	47
<i>5 DISCUSSÃO</i> -----	94
<i>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</i> -----	102
<i>7 REFERÊNCIAS</i> -----	104
<i>8 ANEXOS</i> -----	115

Nassar PO. Avaliação do efeito da Sinvastatina em ratos submetidos a periodontite experimental e imunossuprimidos por Ciclosporina-A e Tacrolimus [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Há relatos na literatura que os ossos de maneira geral assim como o processo alveolar são acometidos pela Ciclosporina-A (CsA) desequilibrando sua homeostase, induzindo a perda óssea. Alguns trabalhos experimentais mostram que o Tacrolimus (FK506) induz perda óssea, enquanto outros relatam conferir uma proteção contra inflamação e perda óssea associada à periodontite, em ratos com doença periodontal induzida. Adicionalmente, tem sido recentemente revelado que algumas estatinas poderiam estimular a formação óssea e inibir a reabsorção óssea. Assim os objetivos do estudo foram avaliar os efeitos da administração da CsA, FK506 associados ou não com sinvastatina no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos submetidos a modelo de periodontite experimental, através de avaliações bioquímica, molecular e esterométrica. Foram utilizados 320 ratos divididos em 32 grupos e em diferentes períodos de 15, 30 e 60 dias associados ou não a periodontite experimental e/ou a administração diária de CsA (10mg/kg por peso corporal), FK506 (1mg/kg por peso corporal) e Sinvastatina (20mg/kg por peso corporal). Ao final de cada período experimental, coletas de sangue foram realizadas para medir os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina e biópsias gengivais para as avaliações de ELISA e PCR. Após o processamento histológico, a densidade volumétrica de osso, osteoblastos e osteoclastos foram medidas na região de primeiro molar inferior. Após 15 e 30 dias de tratamento quando associado ao uso de Sinvastatina, houve melhora nos parâmetros

bioquímicos em relação à CsA ($p < 0.05$) e sem ser significativa em relação ao FK506 ($p > 0.05$) com ou sem associação de doença periodontal. As mesmas características apresentaram-se nos resultados estereométricos. Dentro dos limites do nosso estudo, a Sinvastatina parece promover um bom efeito protetor sobre a CsA, principalmente na presença de doença periodontal induzida, enquanto que com o FK506, ela não mostrou este efeito, uma vez que o mesmo parece minimizar a progressão da doença periodontal em modelos animais.

Palavras-chave: Tacrolimo; doenças periodontais; ciclosporina; sinvastatina; osso

Nassar PO. Evaluate of effect of Sinvastatin in rats with experimental periodontitis and immunosuppressed for Ciclosporin-A and Tacrolimus [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

In the literature that the bones as well as the alveolar process are attack by the CsA having unbalanced its homeostasis, inducing the bone loss. Some experimental studies show that the FK506 induced bone loss, while others demonstrated to confer a protection against inflammation and bone loss associate to the periodontitis, in rats with induced periodontal disease. Additionally, he has been recently disclosed that some statins could stimulate the bone formation and inhibit the bone resorption. Thus the objectives of the study had been to evaluate the effect of the administration of the CsA, FK506 associates or not with sinvastatin in the development of the induced periodontal disease in submitted rats the model of experimental periodontite, through evaluations biochemistry, molecular and stereometric. 320 rats divided in 32 groups and different periods of 15, 30 and 60 days had been used associates or not to the experimental periodontitis and/or the daily administration of CsA (10mg/kg body weight), FK506 (1mg/kg body weight) and Sinvastatin (20mg/kg body weight). At the end of period experimental, blood collection was obtained and serum levels calcium, phosphorus and alkaline phosphatase were measured and ELISA end PCR analysis were extracted from gingival tissue samples. After the histologic processing, the volumetric density of bone, osteoblasts and osteoclasts had been measured in the first region molar inferior. After 15 and 30 days of treatment when associated to the use of sinvastatin, it had improvement in the parameters biochemistries in relation to the CsA ($p < 0,05$) with or without

association of periodontal disease The same characteristics had been presented in the stereometric analysis. Within of the limits of our study, sinvastatin seems to mainly promote a good protective effect on the CsA, to the experimental periodontitis, while that with the FK506, it did not show this effect, a time that the same seems to minimize the progression of the periodontal disease in animal models.

Keywords: Tacrolimus; periodontal diseases; cyclosporin; sinvastatin; bone.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na prática clínica, o transplante de órgãos visa melhorar um déficit funcional, a menos que o doador e receptor sejam geneticamente idênticos, os antígenos do enxerto são capazes de provocar resposta de rejeição imunológica. Um transplante pode estimular todos os mecanismos de imunidade humoral e celular, específicos e inespecíficos¹⁶.

Na última década ocorreram avanços substanciais na compreensão de eventos que controlam o sistema imune e dos efeitos seletivos das drogas, capazes de alterar a função imune produzindo não apenas imunodeficiências, mas também uma imunopotencialização. Os agentes mais comumente utilizados na imunoterapia sistêmica são os esteróides, ciclofosfamida, azatioprina, mofetil micofenolato, metotrexato, sirolimus (rapamicina), anticorpos monoclonais, ciclosporina (CsA) e Tacrolimo (FK506)^{12,16,40,62}.

Há alguns anos junto com o aprimoramento de técnicas cirúrgicas, as drogas imunossupressoras, principalmente as de última geração, propiciaram de modo incontestável avanços significativos no sucesso na inibição da rejeição de transplantes⁶⁵. Deste modo com a utilização da CsA ou mais recentemente do FK506, a incidência e a severidade dos episódios de rejeição aguda e crônica foram sensivelmente reduzidos^{44,65}. O uso do FK506 foi estabelecido como uma alternativa de protocolo de tratamento imunossupressor em substituição à CsA. O FK506 possui uma atividade imunossupressora até 100 vezes maior que a CsA³³.

A farmacodinâmica do FK506 é similar à CsA⁵⁶. Resumindo, o mecanismo de ação da CsA e do FK506 se baseia na ligação dessas drogas à duas proteínas cálcio dependentes chamada ciclofilina – uma proteína intracelular de ligação da família da calmodulina (17kDa). Dessa forma inibem a atividade da calcineurina, inibindo eventos cálcio-dependentes, induzindo redução da transcrição do gene para IL-2, gerando marcante efeito inibidor nos eventos iniciais da proliferação de linfócitos-T.

Dados experimentais mostram que, além da inibição da síntese de interleucina IL-2, a CsA e o FK506, reduzem a ativação do óxido nítrico sintase (NOS)⁷, degranulação celular e apoptose⁶⁰. Mediante a diferentes protocolos de pesquisa e através de mecanismos distintos, esses imunossupressores podem desregular a ação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e seus receptores^{25,51}, IL-1 beta¹⁵, expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) e produção de prostaglandinaE2 (PGE-2)⁷. A expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e interferon-gama (IFN-gama) parecem estar aumentadas em camundongos tratados com FK506⁴⁸. Dessa forma esses dados podem sugerir que direta ou indiretamente a CsA e o FK506 possam alterar o processo inflamatório.

Tem sido reiteradamente demonstrado que praticamente todas as drogas, principalmente as imunossupressoras, como a CsA e o FK506 têm efeitos secundários indesejáveis. Deve-se ressaltar que seus benefícios suplantam em muitos os efeitos indesejáveis. FK506 demonstra tendência para o

desenvolvimento de diabetes e neurotoxicidade quando comparado com à CsA^{21,52} e induz nível similar de nefrotoxicidade⁸.

Na população de pacientes transplantados, a prevalência de doenças cardiovascular é consideravelmente alta aumentando a morbidade e a mortalidade. A etiologia das doenças cardiovasculares nestes pacientes parece ser multifatorial envolvendo processos imunológicos (ex: rejeição e infecções por citomegalovírus) ou processos metabólicos (Dislipidemia ou síndrome metabólica) A dislipidemia é uma importante ocorrência em pacientes transplantados, pois aumentam a predisposição à complicações cardiovasculares, acidentes cerebrovasculares, hipertensão e aterosclerose. A CsA e FK506 podem estar associados com essas alterações^{31,61}. Nesses casos o uso das estatinas pode estar presente no protocolo de tratamento dos pacientes transplantados, pois podem diminuir não unicamente o nível de colesterol, mas também a morbidade e a mortalidade pós-transplante^{1,24,31}. Por outro lado as estatinas têm efeito imunossupressivo e imunorregulador que pode ser benéfico no tratamento de pacientes transplantados^{4,28}. As estatinas ou inibidores da 3-hidroxi –3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA) são amplamente usadas para tratamento da dislipidemia e podem ser encontradas como lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e cerivastatina³⁶.

Há relatos na literatura que os ossos de maneira geral assim como o processo alveolar são acometidos pela CsA desequilibrando sua homeostase, induzindo a perda óssea¹³. Algumas variáveis como doenças ósseas

preexistentes, dose da CsA, idade³⁷ e gênero¹⁸ são citadas como fatores de risco que podem alterar a prevalência dessas alterações^{17,19,26,27,55}. A ação do FK506 sobre o tecido ósseo é incerto e conflitante. Alguns trabalhos experimentais mostram que o FK506 induz perda óssea^{5,11,50,53,59}, enquanto outros trabalhos relatam que o FK506 favorece o metabolismo ósseo, promovendo diferenciação osteoblástica, mantendo a densidade mineral óssea normal^{22,32}, além de conferir uma proteção contra inflamação e perda óssea associada à periodontite, em ratos com doença periodontal induzida²³.

Recentes estudos têm mostrado que a sinvastatina tem ampla ação, e são capazes de modificar o processo de perda óssea^{10,63}. Estudos “in vitro” indicam que a sinvastatina inibe a formação de osteoclastos assim como induz o aumento da apoptose dessas células^{41,58,64}. Por outro lado, verificou-se que ratos tratados com CsA apresentaram perda óssea alveolar onde tal alteração estava associada ao aumento da densidade volumétrica de osteoclastos^{20,55,57,68}. Tem sido demonstrado, ainda, que as estatinas estimulam a produção do gene da proteína óssea morfogenética-2 (BMP-2) em cultura de osteoblastos e estimulam a regeneração óssea de ratas ovariectomizadas^{47,63}. Adicionalmente, tem sido recentemente revelado que algumas estatinas poderiam estimular a formação óssea e inibir a reabsorção óssea. Este efeito de formação óssea foi associado com o aumento na expressão do gene da BMP-2⁴⁶.

Mundy et al.⁴² (2001), demonstrou que várias estatinas, especialmente a sinvastatina e a lovastatina, estimulam a formação óssea quando injetada subcutaneamente sobre a calvária e também aumentou a expressão do RNAm

de BMP-2 em osteoblastos. Seguindo este estudo, outros estudos in vitro confirmaram seu efeito positivo na formação óssea e estudos clínicos focados em doenças ósseas, especialmente osteoporose, têm sido publicados. Este efeito colateral da estatina poderia ser interessante na regeneração de defeitos periodontais, especialmente a regeneração dos tecidos duros⁶⁴.

Em estudos recentes, os efeitos estimulatórios das estatinas nas células osteoblásticas e tecido ósseo têm sido mostrado^{10,28}. As células do ligamento periodontal são relatadas ser semelhantes às células de fibroblastos e também às células dos tecidos duros, tais como osteoblastos e cementoblastos. Devido à importância da terapia regenerativa no tratamento periodontal, Yazawa et al.⁶⁴ (2005) investigaram os efeitos da sinvastatina nas células do ligamento periodontal, focando especialmente na proliferação e metabolismo celular e o seu potencial de mineralização, demonstrando que as concentrações relativamente baixas de sinvastatina promoveram proliferação celular e diferenciação osteoblástica de células humanas do ligamento periodontal, entretanto, quando as concentrações foram mais altas ela teve um efeito negativo.

As estatinas têm propriedades antiinflamatórias e imunomodulatórias, reduzindo os níveis de proteína C-reativa (CRP) e matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) e seus produtos intermediários, como o TNF- α . A alta atividade de MMPs e TNF- α pode promover doença periodontal por estimular destruição periodontal. Portanto, há mecanismos biológicos plausíveis pelos quais o uso

das estatinas poderiam ter um impacto benéfico na doença periodontal, que é dada por defeitos ósseos e inflamação associados com a periodontite crônica¹⁰.

O desenvolvimento de novas estatinas mais específicas para osso serão necessárias para a prevenção ou tratamento de osteoporose. Na cavidade oral, a adição de estatinas em combinação com drogas tradicionais usadas no tratamento de osteoporose, tais como, 17β -estradiol e hormônio paratireóide humano (hPTH), elevam a massa óssea na mandíbula, especialmente no osso alveolar. Sugere-se então, que o uso da estatina pode suprimir a progressão da doença periodontal de pacientes com osteoporose²⁸.

2 PROPOSIÇÃO

Mediante aos crescentes e importantes fatos documentados sobre os efeitos indesejáveis dos imunossupressores, procurar-se-á através deste trabalho, avaliar as possíveis alterações bioquímicas e moleculares induzidas pela CsA, FK506 e Sinvastatina, que podem interagir e interferir nas reações teciduais alterando a homeostasia dos tecidos periodontais saudáveis ou submetidos a indução de doença periodontal inflamatória. Desta forma, os objetivos específicos são:

- Determinar a concentração sérica de cálcio (Ca^{2+}), fosfatase alcalina (ALP) e fósforo no sangue de ratos submetidos ou não a doença periodontal inflamatória, tratados com CsA ou FK506 associados ou não ao tratamento com sinvastatina.
- Comparar a expressão das isoformas de NOS e a expressão de IL-1 β e PGE-2 nas amostras de tecido gengival de ratos submetidos ou não a doença periodontal inflamatória, tratados com CsA ou FK506 associados ou não ao tratamento com sinvastatina.
- Avaliar os efeitos da administração da CsA, FK506 associados ou não com sinvastatina no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos submetidos a modelo de periodontite experimental.
- Determinar através da estereometria a densidade volumétrica do processo alveolar, de osteoblastos e de osteoclastos de ratos tratados com CsA e FK506 com ou sem o uso concomitante da sinvastatina e associar às eventuais alterações bioquímicas e moleculares.

3 MATERIAL E MÉTODO

I-ANIMAIS

Para o presente trabalho foram utilizados 320 ratos (*Ratus norvegicus albinus*, Holtzmann), machos, jovens com peso inicial de aproximadamente 100g, provenientes do Biotério Central da UNESP, Câmpus de Araraquara. Os ratos foram mantidos em gaiolas plásticas, separados de acordo com o grupo experimental e, alimentados com ração e água *ad libitum*.

II- DILUIÇÃO DA CsA

A CsA * recebida em ampolas para infusão intravenosa, na concentração de 50 mg/mL, foi diluída com solução de NaCl a 0,9% obtendo-se concentração final de 10mg/mL.

III- DILUIÇÃO DO TACROLIMO (FK506)

O FK506** recebido em ampolas de 5mg/mL, foi diluído com solução de NaCl a 0,9% na concentração final de 1mg/mL.

IV- DILUIÇÃO DA SINVASTATINA

A sinvastatina*** recebida em comprimidos de 20 mg, foi diluída em água esterilizada na concentração final de 20mg/mL.

*CsA- Sandimmun® Novartis-Brasil

**Prograf® - Janssen-Cilag – Brasil

*** Sinvastatina- Novartis - Brasil

V- INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40, ao redor dos primeiros molares inferiores de ambos os lados. Esta ligadura atuou como irritante gengival e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana.

VI- GRUPOS EXPERIMENTAIS

Trezentos e vinte ratos foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos que foram assim constituídos:

O grupo I composto de 6 subgrupos de 10 animais cada: 1- Controle que foram tratados com solução NaCl a 0,9%; 2- Tratados com CsA na dose de 10 mg/kg de peso corporal/dia, por via subcutânea⁶⁷; 3- Tratados com sinvastatina na dose de 20,0 mg/Kg/dia via oral^{14,36}; 4- Tratados concomitantemente com CsA e Sinvastatina nas mesmas dosagens previamente estabelecidas; 5- Tratados com FK506 na dose de 1,0mg/kg de peso/dia via subcutânea^{34,35} e 6- FK506 e Sinvastatina concomitantemente nas dosagens previamente estabelecidas. O período de tratamento foi de 15 dias.

O grupo II composto de 6 subgrupos de 10 animais cada foram submetidos aos mesmos tratamentos do grupo anterior, associados à indução de doença periodontal inflamatória. O período de tratamento foi de 15 dias.

O grupo III composto de 6 subgrupos de 10 animais cada , foram submetidos aos mesmos tratamentos que o grupo I. O período de tratamento foi de 30 dias.

O grupo IV composto de 6 subgrupos de 10 animais cada foram submetidos aos mesmos tratamentos que o grupo II. O período de tratamento foi de 30 dias.

O grupo V, por fim, foi composto de 8 subgrupos de 10 animais cada sendo estes tratados diariamente no período de 60 dias, de acordo com os seguintes tratamentos: 13- Controle com solução de NaCl a 0,9%; 14- CsA a 10 mg/kg de peso corporal, por via subcutânea; 15- sinvastatina 20,0 mg/Kg via oral; 16- CsA e sinvastatina conjuntamente nas mesmas dosagens previamente estabelecidas; 17- do início até o 30^o dia somente CsA e a partir do 30^o dia até o final do período experimental, CsA e sinvastatina; 18- FK506 a 1,0mg/kg de peso via subcutânea; 19- FK506 e sinvastatina conjuntamente nas mesmas dosagens previamente estabelecidas e 20- do início até o 30^o dia somente FK506 e a partir do 30^o dia até o final do período experimental, FK506 e sinvastatina. A Tabela 1 mostra o protocolo experimental

Tabela 1 - Protocolo experimental. Distribuição dos 320 ratos de acordo com o tratamento experimental.

			15 DIAS	30 DIAS	60 DIAS
	GRUPO I (n=10) cada	1 2 3 4 5 6	Controle CsA Sinvastatina CsA + Sin FK506 FK506 + Sin		
	GRUPO II (n=10) cada	7 8 9 10 11 12	Ligadura Ligadura + CsA Ligadura + Sin Ligadura + CsA + Sin Ligadura + FK506 Ligadura+FK506 +Sin		
N=320	GRUPO III (n=10) cada	13 14 15 16 17 18		Controle CsA Sinvastatina CsA + Sin FK506 FK506 + Sin	
	GRUPO IV (n=10) cada	19 20 21 22 23 24		Ligadura Ligadura + CsA Ligadura + Sin Ligadura+CsA + Sin Ligadura + FK506 Ligadura +FK506+ Sin	
	GRUPO V (n=10) cada	25 26 27 28 29 30 31 32		CsA FK506	Controle CsA Sinvastatina CsA + Sin CsA + Sin FK506 FK506 + Sin FK506 + Sin

VII- AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Após os períodos estabelecidos para o tratamento (15, 30 e 60 dias), todos os ratos dos 5 grupos receberam anestesia geral, obtida com injeção

intramuscular de 0,08 ml/100g por peso corporal de ketamina* e 0,04/100g por peso corporal de cloridrato de xilasina** .

Nos casos em que não se obteve o efeito anestésico desejado, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

Os ratos foram submetidos à coleta de amostras de sangue (aproximadamente 6mL) da aorta abdominal descendente em tubos cônicos de plástico. As amostras foram mantidas em estufa a 37°C por aproximadamente 15 min para estabelecer a retração do coágulo. Após a retração do coágulo a amostra foi centrifugada à 2500 rpm por 10min para a separação do soro. Através do soro foi determinada a concentração de Ca^{2+} e fósforo e atividade de ALP.

A determinação de Ca^{2+} , foi feita através do método espectrofotométrico (o Ca^{2+} reage com a púrpura e ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta que é medido em 570 nm), utilizando-se para isso o Kit Labtest Diagnóstica. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Para a determinação da ALP foi utilizado o método colorimétrico. Este método utiliza a reação de hidrólise do p-nitrofenilfosfato, pela ALP, com formação do produto colorido p-nitrofosfato, utilizou-se para isso Kit Bayer-Sera Pak® alkaline phosphatase (SCE) e os resultados foram expressos em U/L. Para as leituras espectrofotométricas das análises de Ca^{2+} e ALP, foi utilizado o espectrofotômetro Autoanalyser Technicon RA-Xt.

*Francotar®, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda

**Virbaxyl 2%, Virbac do Brasil Ind. E com. Ltda

A determinação de fósforo foi medida colorimetricamente, onde os íons fosfato reagem com o íon molibdato em meio ácido, formando um complexo amarelo, que por ação de um tampão alcalino é reduzido a azul-molibdênio, utilizando-se para isso o Kit Fósforo-Labtest Diagnóstica. Os resultados foram expressos em mg/dL.

VIII- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE NOS, IL-1 β E PGE-2

Expressão de NOS

A presença de mRNA para as diferentes isoformas de NOS foram avaliadas pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR).

O RNA total do tecido gengival foi extraído com o reagente Trizol, segundo o protocolo do fornecedor (Invitrogen Corp.). A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 - Thermo Electron Corporation) por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente.

A síntese de cDNA foi realizada subsequentemente em termociclador (MyCycler - Bio-Rad), utilizando 800 ng de RNA total na presença de Oligo-dT (12-18) primers, dNTPs, MgCl₂ e enzima de transcriptase reversa, segundo as instruções do fabricante (Improm II - Promega).

Os pares de primers específicos para e-NOS e iNOS e para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) estão apresentados na Tabela 2. GAPDH foi utilizado como controle endógeno do RT-PCR por ser um gene

constitutivo, cuja expressão não se altera com a indução da doença periodontal. Embora as seqüências de pares de primers específicas para os genes-alvo de camundongos tenham sido publicadas na literatura, as condições da reação de PCR (incluindo concentração de primers, temperatura de anelamento e número de ciclos) foram otimizadas em experimentos-piloto. As seqüências dos RNAs mensageiros utilizadas neste trabalho foram obtidas no banco público de dados NCBI.

Tabela 2 – Seqüência de Primers específicos e condições iniciais da reação do RT-PCR para e-NOS e i-NOS.

Gene	Primers (5' – 3') Sense (S) e antisense (AS)	Acession#	Ta (°C)	Amplicon	Ciclos
<i>GAPDH</i>	CACCATGGAGAAGGCCGGGG – S GACGGACACATTGGGGGTAG – AS	BC083065	52	418 bp	25
<i>I-NOS</i>	ACAACAGGAACCTACCAGCTCA– S GATGTTGTAGCGCTGTGTGTCA- AS	NM012611	54	651 bp	38
<i>E-NOS</i>	GGAAGATGTTCCAGGCTACAA- S TAGAGATGGTCCAGTTGGGAG- AS	NM021838	56	904 bp	38

A reação de PCR foi feita em termociclador (My Cycler - Bio-Rad), com um volume total de 25 µL, utilizando 2 µL do produto da reação de transcriptase reversa na presença de 100 pmol/µL de primers de cada gene (50 pmol/µL de cada primer, *sense* e *antisense*), além de uma concentração de MgCl₂ de 1,5 mM para ambos os genes. Os produtos da reação de PCR foram resolvidos por meio de eletroforese em gel de agarose a 1.5% (Invitrogen Corp.) e corados com brometo de etídeo (0.5 µg/mL – Invitrogen Corp.). Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis (Image Quant 100 – GE

Healthcare) e submetidas à análise densitométrica. A expressão do gene - alvo foi normalizada para a expressão do *housekeeping gene* (GAPDH) e expressa como *fold change* em relação ao controle negativo.

Expressão da IL1- β e PGE-2

Uma porção de tecido gengival ao redor dos dentes submetidos ou não a colocação de ligadura de todos os grupos experimentais, foi removida e utilizada para análise por Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas (ELISA) da presença das citocinas IL1- β e PGE-2.

O total de proteínas foi extraído das amostras de tecido gengival usando um tampão de extração a base de detergente (T-PER, Tissue Protein Extraction Reagent - Pierce) contendo um coquetel de inibidor de protease (Protein Stabilizing Cocktail - Santa Cruz Biotechnology) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram maceradas em tampão (50 μ L/mg de tecido) e centrifugado por 5 minutos à 13.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante concentrado foi quantificado utilizando o sistema de quantificação de proteína Bradford (Bio-Rad).

Para a detecção e quantificação de IL-1 β foi utilizado 50 μ L de amostra e 50 μ L de tampão e para PGE2 foi utilizado 10 μ L de amostra, 2 μ L de indometacina a 5 mg/L e 88 μ L de tampão, ambos num comprimento de onda de 450 a 550 nm de acordo com os Kits ELISA (IL-1- β ELISA Kit Biosource e PGE-2 kit Assay designs – Correlate - EIA^m respectivamente), segundo as instruções do fabricante.

IX- OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS

Após a coleta do sangue os animais foram sacrificados com injeção excessiva do anestésico e logo após o sacrifício, a mandíbula de cada animal foi retirada, fixada em formol tamponado (pH 7.2) durante 48 horas. Em seguida as mandíbulas foram lavadas em água corrente por 24 horas. Após estes procedimentos, as mandíbulas foram imersas em solução descalcificadora constituída de partes iguais de ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20% (solução de Morse) e trocadas três vezes por semana.

Após a descalcificação, as mandíbulas foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as mandíbulas foram incluídas em parafina, de forma padronizada para obtenção de cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura no sentido vestibulo lingual e foram corados com Hematoxilina e Eosina.

X- OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

A análise microscópica foi realizada por um único examinador através da avaliação dos cortes histológicos corados. As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Carl Zeiss, Germany) para observações morfológicas do processo alveolar das hemimandíbulas direitas.

XI- ESTEREOMETRIA DO PROCESSO ALVEOLAR

Em cortes de 5 μm da gengiva marginal dos 1^{os} molares inferiores direito, foi feita a determinação da densidade volumétrica de osteoclastos, do tecido ósseo e osteoblastos. As contagens foram feitas separadamente. Foram quantificadas 3 diferentes localizações anatômicas: região bucal (correspondente à face vestibular do processo alveolar), apical/interradicular (região próximo ao ápice) e a porção palatina (correspondente a face lingual do processo alveolar) seguindo os métodos de Shen et al.⁵⁵ (2001) (Figura 1).

Os parâmetros estereométricos foram quantificados de acordo com os métodos descritos por Huja et al.²⁹ (2006) A nomenclatura e abreviações foram seguidas àquela estabelecida pela “Academia Americana de Pesquisa Óssea e Mineral”⁴⁹. Foram quantificados: Volume ósseo/Volume total ($\text{BV/TV \%} \times 400$), que representa volume ósseo (BV mm^3) pelo total de volume tecidual (TV mm^3); Número de osteoblastos em determinada superfície (N.Ob/BS/mm^2) e número de osteoclastos por superfície (N.Oc/BS/mm^2). As medidas foram realizadas com a ajuda de um microscópio Zeiss numa magnificação de 400x, acoplado a um computador Pentium IV. A distância entre os cortes foi de 50 μm entre uma contagem e outra. Na contagem de células, considerou-se como osteoclastos, células multinucleares grandes encontradas próximas a superfície escavada do osso alveolar³ e considerou-se como osteoblastos, células cuboidais menores que os osteoclastos com um núcleo arredondado e usualmente encontrado em uma superfície próxima ao osso⁶.

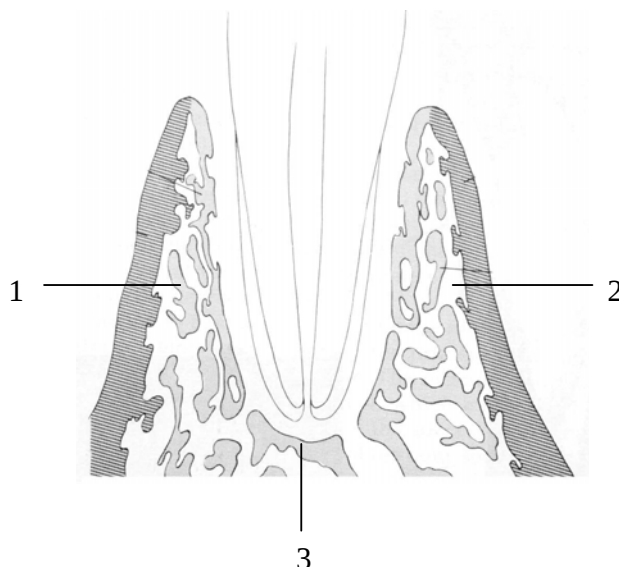


FIGURA 1- Esquema da raiz dentária e osso alveolar, mostrando os pontos de referência usados para as medidas estereométricas do osso nas faces vestibular, lingual e apical.

- 1- Osso da face vestibular
- 2- Osso da face lingual
- 3- Osso da porção apical/Interradicular

XII-ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita com auxílio do programa GB-STAT Plus versão 5.0, considerando o efeito do tempo (15, 30 e 60 dias) e tratamento (Normal, FK506, CsA e Sinvastatina). Inicialmente foi feita análise de variância (ANOVA) e quando foram detectadas diferenças, foi aplicado o teste de Tukey, e se houvessem diferenças entre apenas dois grupos o teste T-Student.

4 RESULTADO

4.1- CsA e Sinvastatina

Avaliação Bioquímica – Período de 15 dias

A Figura 2 (Painéis A, B e C) mostra as comparações das concentrações sanguíneas de Ca^{++} , fósforo e da atividade de ALP respectivamente.

Cálcio:

Com relação ao Ca^{++} , houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos grupos tratados com CsA, Sinvastatina e CsA + Sinvastatina, tanto naqueles que receberam indução da doença periodontal, quanto dos que não receberam (Painel A).

Fósforo:

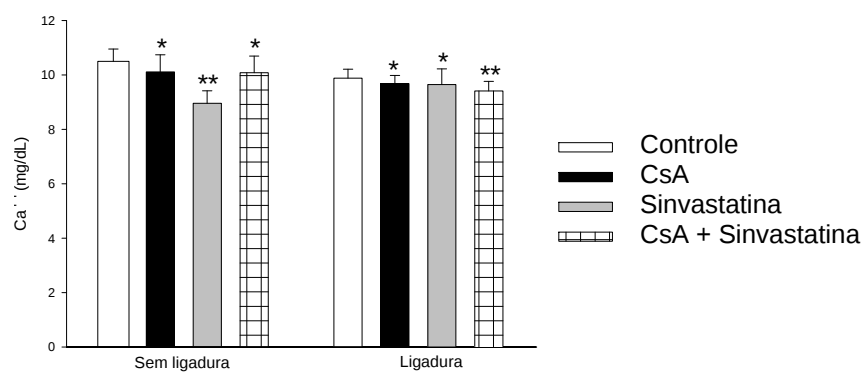
Com relação ao fósforo, quando não submetidos à doença periodontal, houve uma diminuição significativa em todos os grupos tratados em relação ao controle ($p<0,05$), no entanto, no grupo que não foi submetido à doença periodontal, apenas o tratado com CsA teve um pequeno aumento na concentração de fósforo ($p<0,05$) (Painel B).

ALP:

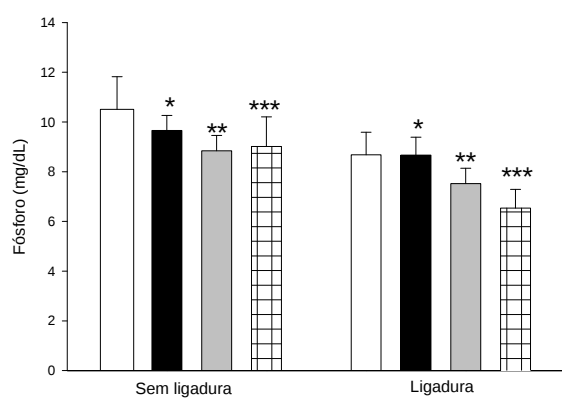
Já com relação à ALP, nos grupos submetidos à doença periodontal, houve um aumento significativo ($p<0,05$) nos grupos tratados com CsA, Sinvastatina e CsA + Sinvastatina. Nos grupos que não foram submetidos a doença periodontal, houve um aumento no grupo tratado com CsA ($p<0,05$) em relação ao controle, uma diminuição no grupo tratado com Sinvastatina ($p<0,05$)

em relação ao controle e nenhuma diferença do grupo tratado com CsA + Sinvastatina em relação ao grupo controle (Painel C).

A



B



C

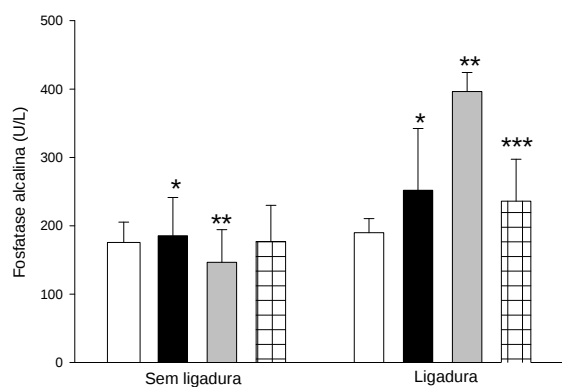


FIGURA 2 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- Nível sérico de cálcio; B- Nível sérico de fósforo e C- Atividade de fosfatase alcalina nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a CsA e/ou Sinvastatina por um período de 15 dias. *, **, *** representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0.05$).

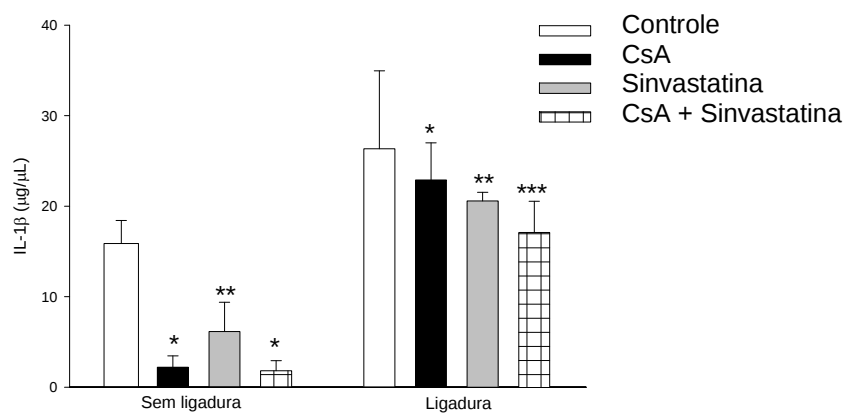
ELISA IL-1 β e PGE2 – período de 15 dias

A Figura 3 (Painéis A e B) mostra as concentrações de IL-1- β e PGE-2 respectivamente.

As concentrações de IL-1- β e PGE2 diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos grupos tratados com CsA, Sinvastatina administrado isoladamente ou juntos, tanto nos grupos que não receberam indução de doença periodontal quanto nos grupos com doença periodontal, quando comparado aos respectivos controles.

Interessantemente, nos grupos com indução de doença periodontal, a associação de CsA + Sinvastatina teve uma maior diminuição na concentração de IL-1- β e de PGE2 ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos Ligadura + CsA e Ligadura + Sinvastatina.

A



B

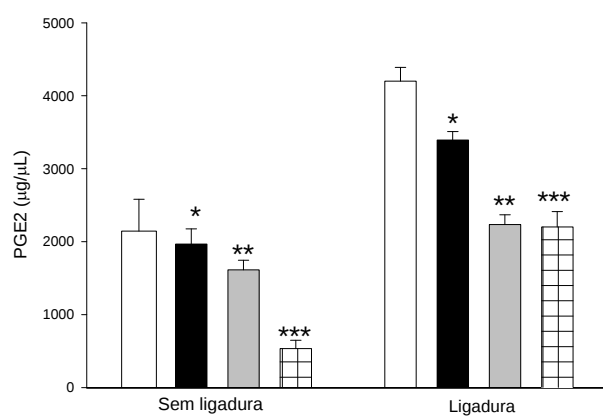


FIGURA 3 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- IL-1 β e B- PGE2, no tecido gengival de ratos nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a CsA e/ou Sinvastatina por um período de 15 dias.

*, **, ***, representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0.05$).

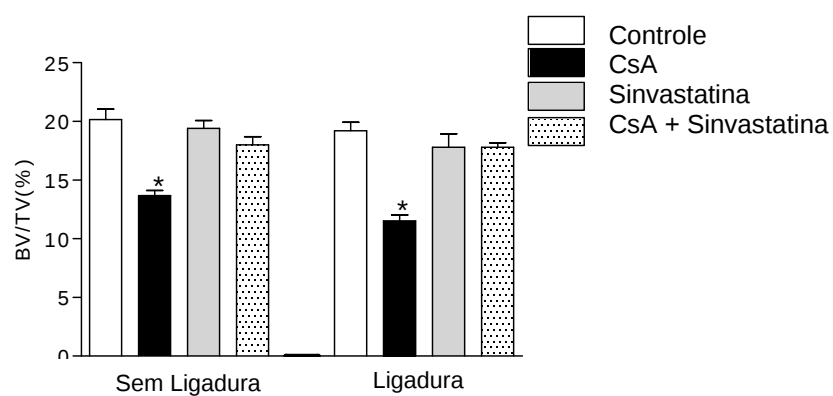
Estereometria do Processo Alveolar – período de 15 dias

A Figura 4 (Painéis A, B e C) mostra as porcentagens da densidade volumétrica de osso alveolar (BV/TV), osteoblasto (NOb/BS) e osteoclasto (NOc/BS), respectivamente. A Figura 5 (Painéis A1, B1, C1 e D1 e A2, B2, C2 e D2) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Controle; B- CsA; C- Sinvastatina; D- CsA + Sinvastatina e a Figura 6 (Painéis A3, B3, C3 e D3 e A4, B4, C4 e D4) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + CsA; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + CsA + Sinvastatina.

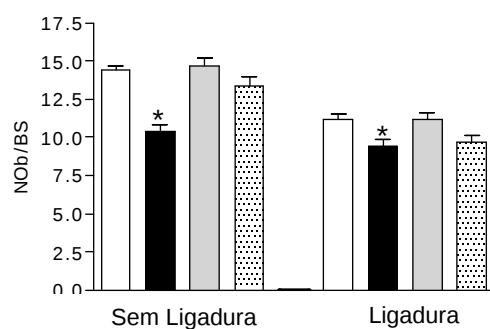
Com relação a BV/TV e a NOb/BS, podemos observar que em ambos os grupos, com e sem doença periodontal, somente o tratado com CsA teve uma diminuição significativa ($p < 0,05$), enquanto os outros grupos tratados tiveram um comportamento semelhante aos seus respectivos controles (Painéis A e B).

A NOc/BS foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com CsA em relação aos outros grupos tratados, tanto nos grupos que não receberam indução de doença periodontal, quanto nos que receberam. Um aumento significativo de NOc/BS ($p < 0,05$), também foi encontrado no grupo CsA + Sinvastatina (Painel C).

A



B



C

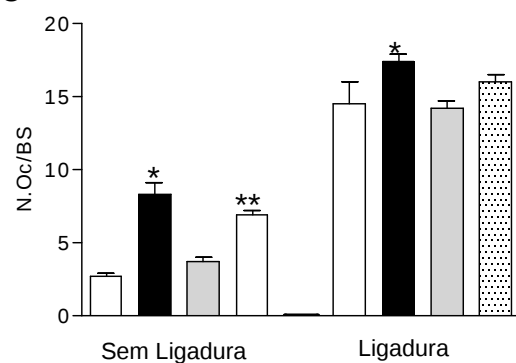


FIGURA 4 - Densidade volumétrica de: A- Osso alveolar; B- Osteoblastos e C- Osteoclastos da região vestibular, lingual e apical/interradicular de primeiro molar inferior de ratos no período de tratamento de 15 dias. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. Os resultados são expressos em porcentagem.

* Representa diferença estatisticamente significante entre as médias nos grupos ($P < 0.05$).

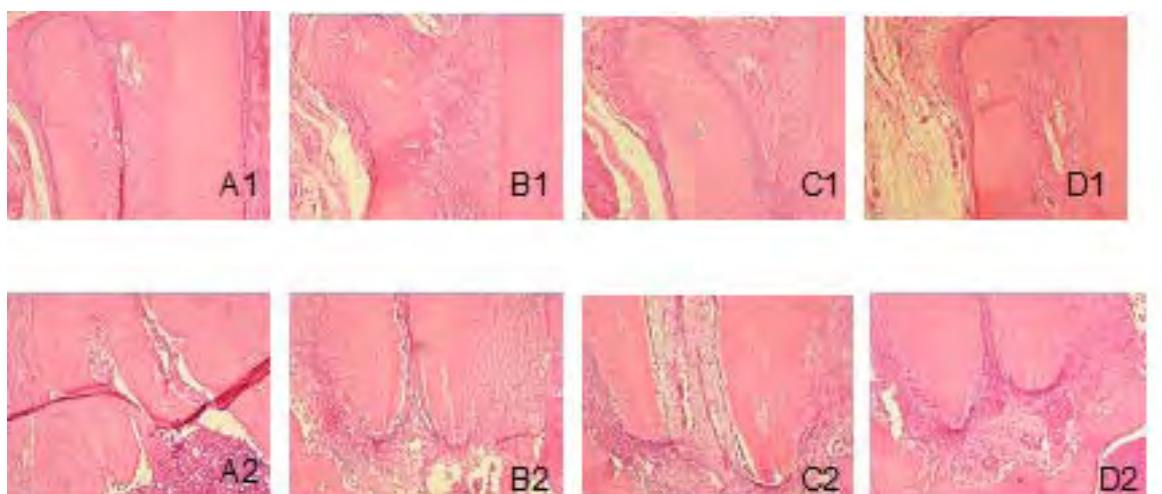


FIGURA 5 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A1, B1, C1 e D1) e na região apical/interradicular (A2, B2, C2 e D2), após 15 dias de período experimental, nos grupos: A- Controle; B- CsA; C-Sinvastatina; D- CsA + Sinvastatina (H.E. 200x).

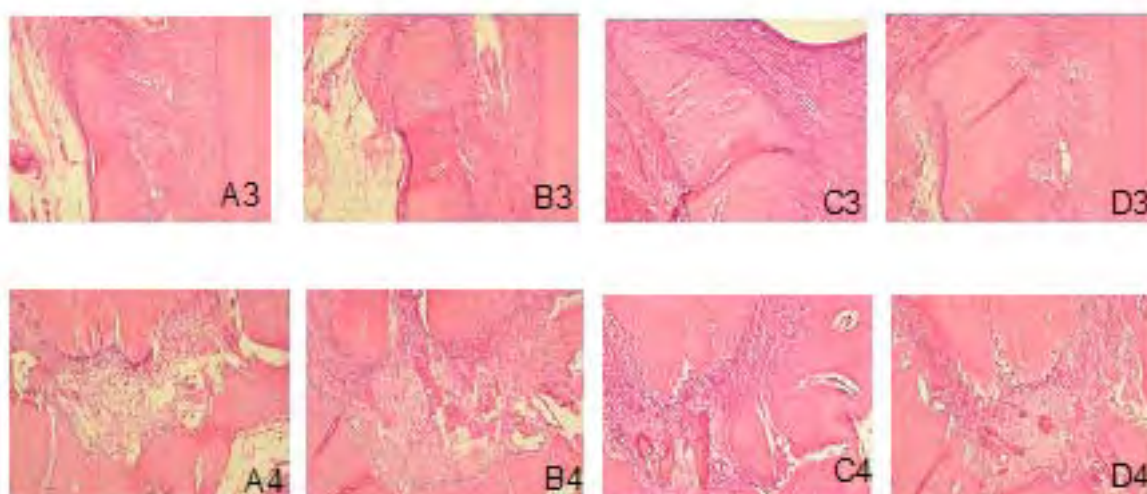


FIGURA 6 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A3, B3, C3 e D3) e na região apical/interradicular (A4, B4, C4 e D4), após 15 dias de período experimental, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + CsA; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + CsA + Sinvastatina (H.E. 200x).

Avaliação Bioquímica – período de 30 dias

A Figura 7 (Painéis A, B e C) mostra as comparações das concentrações sanguíneas de Ca^{++} , fósforo e da atividade de ALP respectivamente.

Nos grupos sem doença periodontal ocorre uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos níveis de Ca^{++} , fósforo e ALP de todos os grupos tratados em relação ao controle (Painéis A, B e C).

Já nos grupos submetidos a doença periodontal, quando tratados com CsA e CsA + Sinvastatina, ocorre uma diminuição ($p < 0,05$) nos níveis de Ca^{++} e ALP e quando tratados somente com Sinvastatina, ocorre um aumento significativo ($p < 0,05$) destes marcadores bioquímicos (Painéis A e C).

Com relação ao fósforo, nos grupos submetidos a doença periodontal, ocorre uma diminuição ($p < 0,05$) quando tratados com CsA e Sinvastatina e um aumento significativo ($p < 0,05$) deste marcador bioquímico quando tratados com CsA + Sinvastatina (Painel B).

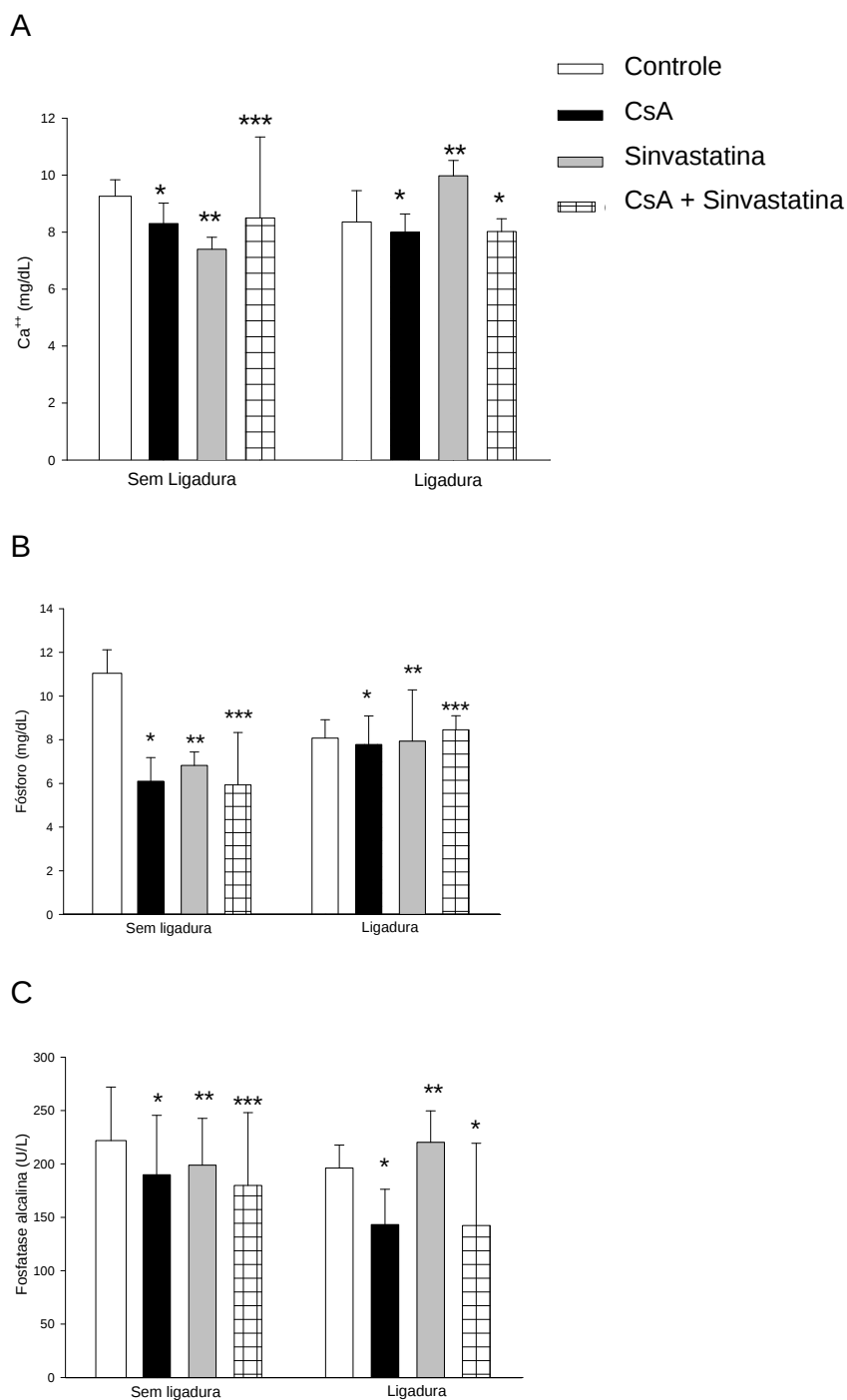


FIGURA 7 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- Nível sérico de cálcio; B- Nível sérico de fósforo e C- Atividade de fosfatase alcalina nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a CsA e/ou Sinvastatina por um período de 30 dias. *, **, *** representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0.05$).

Expressão de NOS (RT-PCR) – período de 30 dias

A Figura 8 (Painéis A e B) mostra a expressão de mRNA de eNOS e iNOS respectivamente.

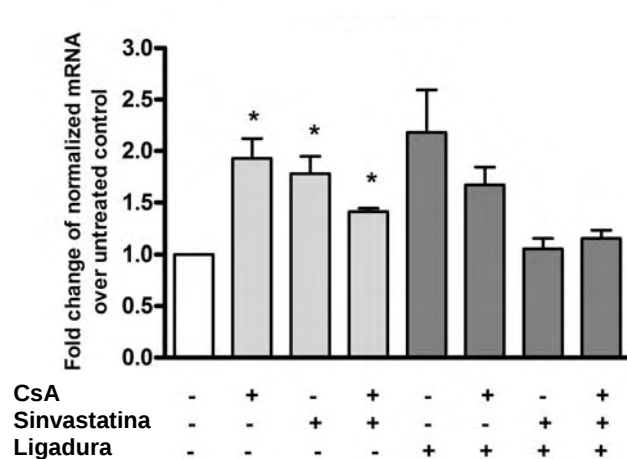
mRNA eNOS:

Com relação a expressão de mRNA de eNOS, os grupos de ratos sem doença periodontal e tratados com CsA, Sinvastatina e CsA + Sinvastatina mostraram um significativo aumento comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). Ao contrário destes resultados, houve uma tendência (não significativa) de diminuição da expressão de eNOS nos ratos com doença periodontal induzida, independentemente do tratamento com drogas (Painel A).

mRNA iNOS:

Com relação ao mRNA de iNOS, houve um significativo aumento na sua expressão nos ratos sem doença periodontal induzida e tratados com CsA ($p < 0,05$) e apenas uma tendência de aumento nos ratos tratados com Sinvastatina e CsA + Sinvastatina. Houve também uma tendência de aumento de iNOS nos ratos submetidos a doença periodontal somente, entretanto, houve uma diminuição na sua expressão quando os ratos com doença periodontal foram submetidos também ao tratamento com CsA, Sinvastatina e CsA + Sinvastatina (Painel B).

A



B

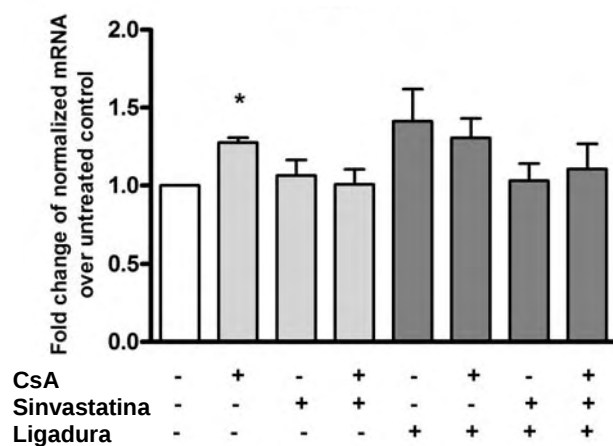


FIGURA 8 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- eNOS and B- iNOS, no tecido gengival de ratos nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associado ou não a CsA e/ou Sinvastatina por um período de 30 dias.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos ($P < 0.05$).

ELISA IL-1 β e PGE2 – período de 30 dias

A Figura 9 (Painéis A e B) mostra as concentrações de IL-1- β e PGE-2 respectivamente.

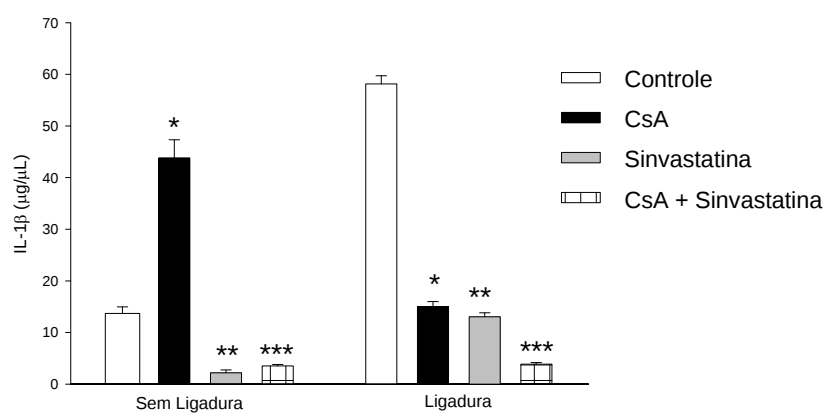
IL-1 β :

Nos grupos não submetidos a doença periodontal, houve um aumento significativo de IL-1 β ($p < 0,05$) apenas quando tratados com CsA enquanto que, os tratados com Sinvastatina e CsA + Sinvastatina, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Por outro lado, quando submetidos a doença periodontal, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de IL-1 β nos grupos tratados com CsA, Sinvastatina e CsA + Sinvastatina em relação ao grupo somente com doença periodontal, principalmente o grupo CsA + Sinvastatina (Painel A).

PGE2:

Com relação à PGE2, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos grupos tratados com CsA e Sinvastatina + CsA, quando não submetidos a doença periodontal, enquanto que, o tratado com Sinvastatina apenas, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Por outro lado, quando submetidos a doença periodontal, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de PGE2 nos grupos tratados com CsA, Sinvastatina e CsA + Sinvastatina em relação ao grupo somente com ligadura (Painel B).

A



B

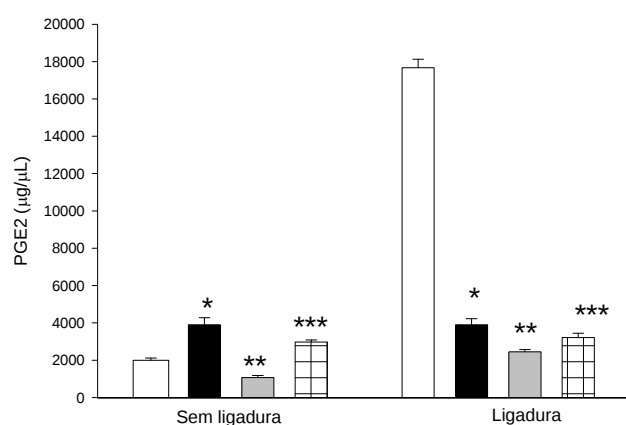


FIGURA 9 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- IL-1 β e B- PGE2, no tecido gengival de ratos nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a CsA e/ou Sinvastatina por um período de 30 dias.

*, **, ***, representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0.05$).

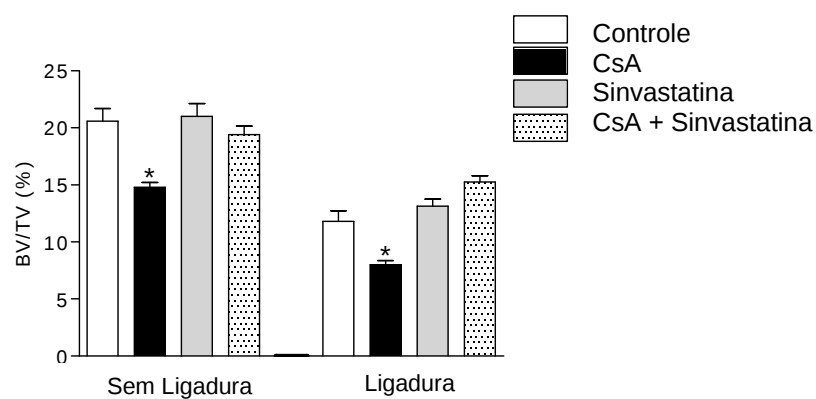
Estereometria do Processo Alveolar – período de 30 dias

A Figura 10 (Painéis A, B e C) mostra as porcentagens da densidade volumétrica de osso alveolar (BV/TV), osteoblasto (NOb/BS) e osteoclasto (NOc/BS), respectivamente. A Figura 11 (Painéis A5, B5, C5 e D5 e A6, B6, C6 e D6) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Controle; B- CsA; C- Sinvastatina; D- CsA + Sinvastatina e a Figura 12 (Painéis A7, B7, C7 e D7 e A8, B8, C8 e D8) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + CsA; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + CsA + Sinvastatina.

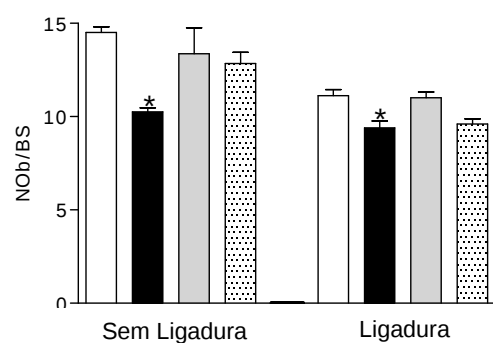
Com relação a BV/TV e NOb/BS, podemos observar que em ambos os grupos, com e sem indução de doença periodontal, somente o tratado com CsA teve uma diminuição significativa ($p < 0,05$), enquanto os outros grupos tratados tiveram um comportamento semelhante aos seus respectivos controles, sendo que os grupos tratados com Sinvastatina e CsA + Sinvastatina quando associados a doença periodontal tiveram uma leve tendência em aumentar a BV/TV (Painéis A e B).

Correspondentemente, a NOc/BS foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com CsA em relação aos outros grupos tratados, tanto nos grupos que não receberam indução de doença periodontal, quanto nos que receberam. Um aumento significativo da NOc/BS ($p < 0,05$), também foi encontrado no grupo CsA + Sinvastatina (Painel C).

A



B



C

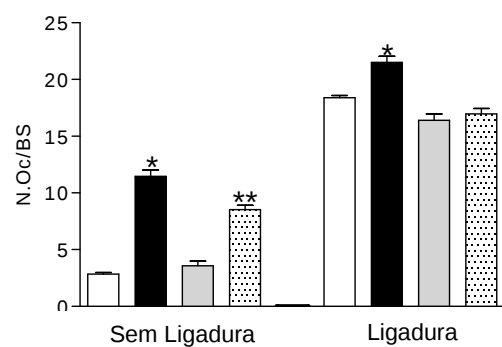


FIGURA 10 - Densidade volumétrica de: A- Osso alveolar; B- Osteoblastos e C- Osteoclastos da região vestibular, lingual e apical/interradicular de primeiro molar inferior de ratos no período de tratamento de 30 dias. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. Os resultados são expressos em porcentagem.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre as médias nos grupos ($P < 0.05$).

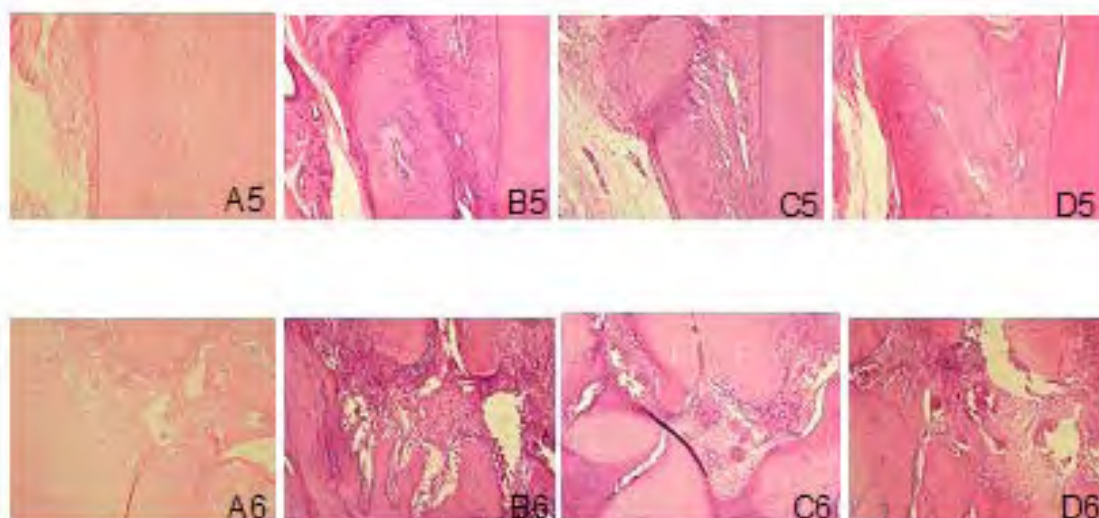


FIGURA 11 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A5, B5, C5 e D5) e na região apical/interradicular (A6, B6, C6 e D6), após 30 dias de período experimental, nos grupos: A- Controle; B- CsA; C-Sinvastatina; D- CsA + Sinvastatina (H.E. 200x).

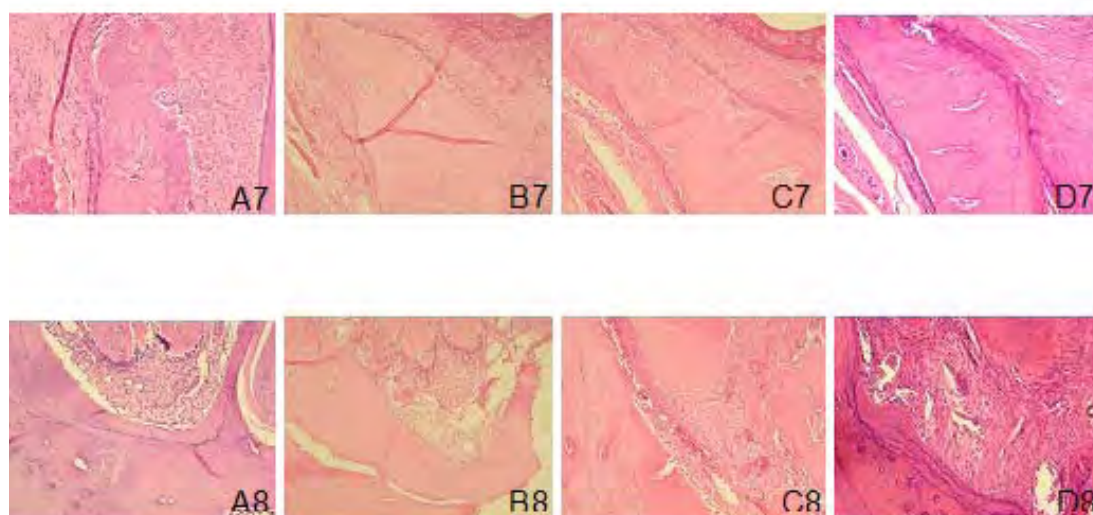


FIGURA 12 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A7, B7, C7 e D7) e na região apical/interradicular (A8, B8, C8 e D8), após 30 dias de período experimental, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + CsA; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + CsA + Sinvastatina (H.E. 200x).

Avaliação Bioquímica – período de 60 dias

A Figura 13 (Painéis A, B e C) mostra as comparações das concentrações sanguíneas de Ca^{++} , fósforo e da atividade de ALP respectivamente.

Cálcio:

Com relação aos níveis sanguíneos de Ca^{++} , houve um pequeno, mas significativo aumento ($p<0,05$) no grupo tratado com Sinvastatina e uma diminuição significativa nos demais grupos tratados ($p<0,05$), quando comparados ao grupo controle, sendo que entre os grupos CsA e CsA + Sinvastatina não houve diferença significativa (Painel A).

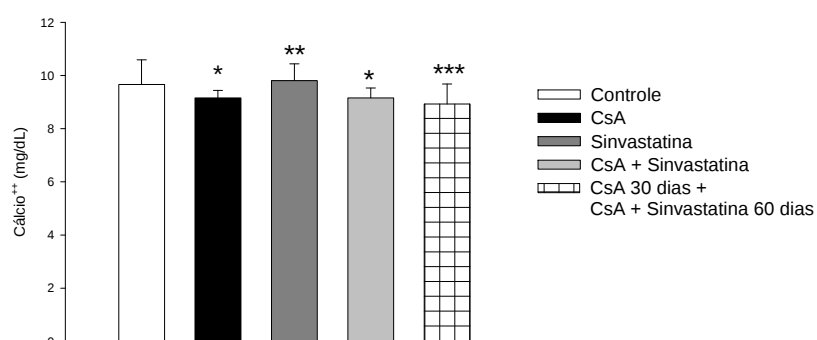
Fósforo:

Com relação aos valores de fósforo, houve um pequeno, mas significativo aumento ($p<0,05$) nos grupos tratados com CsA e Sinvastatina e uma diminuição também significativa ($p<0,05$) nos grupos tratados com CsA + Sinvastatina e CsA 30 dias + CsA + Sinvastatina 60 dias (Painel B).

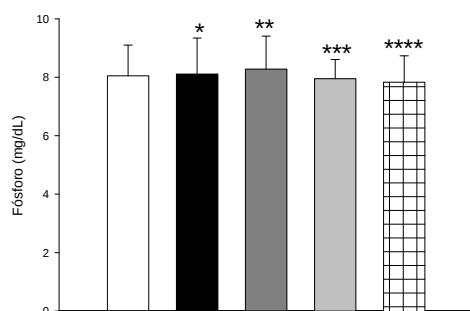
ALP:

Por fim, com relação aos níveis séricos de ALP, houve um aumento significativo ($p<0,05$) nos grupos tratados com CsA e CsA + Sinvastatina e uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos grupos tratados com Sinvastatina e CsA 30 dias + CsA + Sinvastatina 60 dias (Painel C).

A



B



C

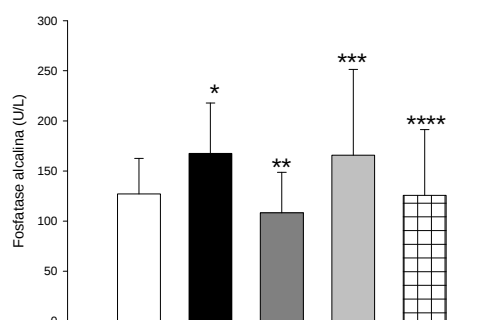


FIGURA 13 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- Nível sérico de cálcio; B- Nível sérico de fósforo e C- Atividade de fosfatase alcalina nos grupos por um período de 60 dias.

*, **, ***, **** representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos ($P < 0.05$).

ELISA IL-1 β e PGE2 60 dias

A Figura 14 (Painéis A e B) mostra as concentrações de IL-1- β e PGE-2 respectivamente.

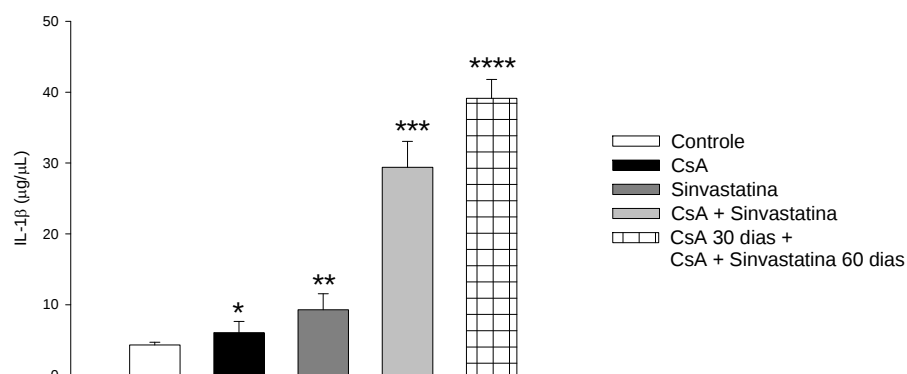
IL-1 β :

Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de IL-1 β em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle (Painel A).

PGE2:

Com relação às concentrações de PGE2, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) apenas nos grupos tratados com CsA e CsA 30 dias + CsA + Sinvastatina 60 dias, enquanto nos grupos tratados com Sinvastatina e CsA + Sinvastatina, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Painel B).

A



B

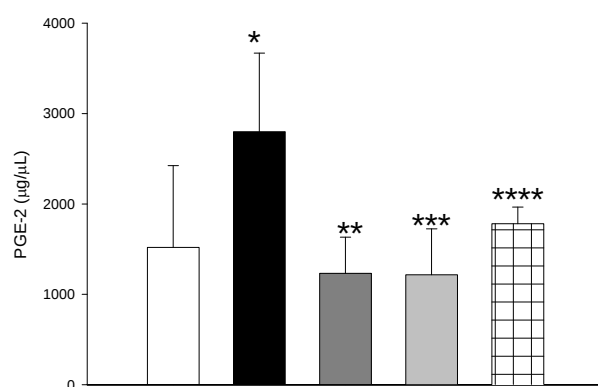


FIGURA 14 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- IL-1 β e B- PGE2, no tecido gengival de ratos nos grupos por um período de 60 dias.

*, **, ***, **** representam diferença estatisticamente significante entre as medias nos grupos ($P < 0.05$).

Estereometria do Processo Alveolar – período de 60 dias

A Figura 15 (Painéis A, B e C) mostra as porcentagens da densidade volumétrica de osso alveolar (BV/TV), osteoblasto (NOb/BS) e osteoclasto (NOc/BS), respectivamente. A Figura 16 (Painéis A9, B9, C9, D9 e E9 e A10, B10, C10, D10 e E10) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Controle; B- CsA; C-Sinvastatina; D- CsA + Sinvastatina ; E- CsA 30 dias + CsA + Sinvastatina.

Com relação a BV/TV e NOb/BS, podemos observar que somente o tratado com CsA teve uma diminuição significativa ($p < 0,05$), enquanto os outros grupos tratados tiveram um comportamento semelhante ao controle, com uma leve tendência em diminuir a BV/TV e a NOb/BS (Painéis A e B).

Com relação a NOc/BS, houve um aumento em todos os grupos tratados, porém apenas no grupo tratado com CsA este aumento foi significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Painel C).

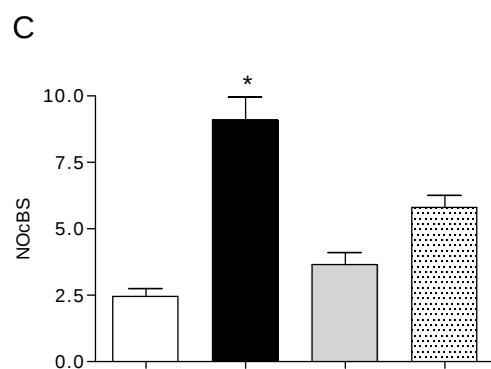
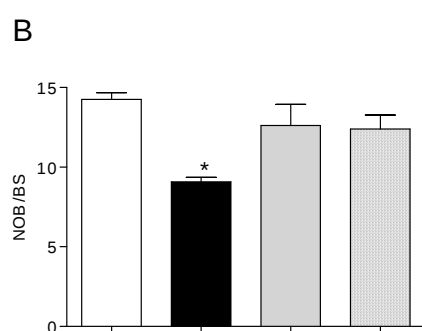
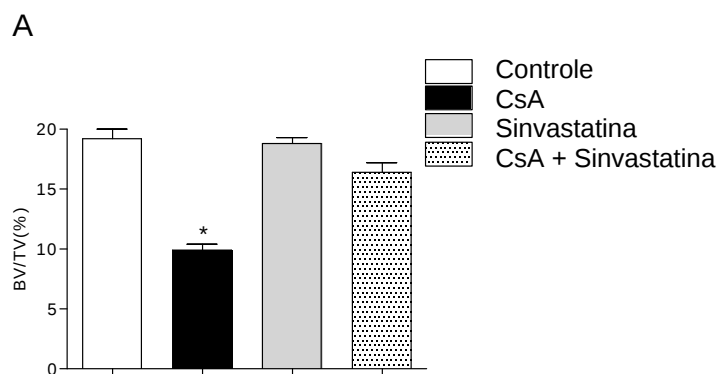


FIGURA 15 - Densidade volumétrica de: A- Osso alveolar; B- Osteoblastos e C- Osteoclastos da região vestibular, lingual e apical/interradicular de primeiro molar inferior de ratos no período de 60 dias. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. Os resultados são expressos em porcentagem.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre as médias nos grupos ($P < 0.05$).

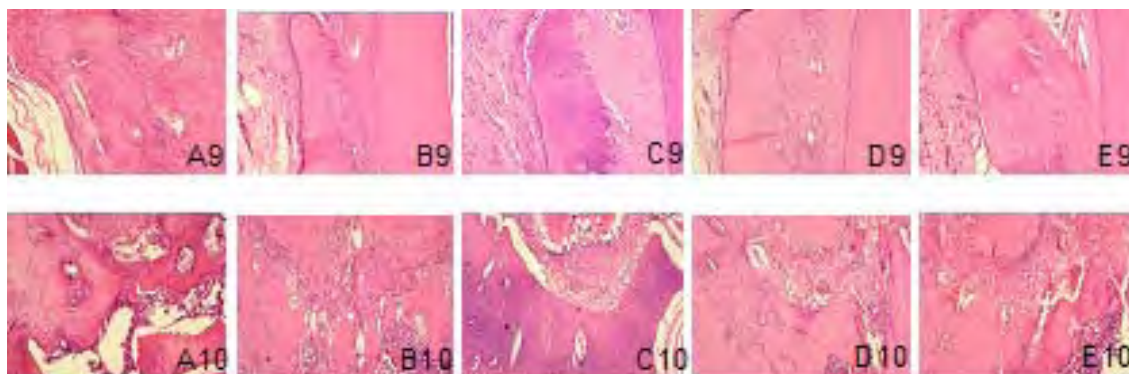


FIGURA 16 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A9, B9, C9, D9 e E9) e na região apical/interradicular (A10, B10, C10, D10 e E10), após 60 dias de período experimental, nos grupos: A- Controle; B- CsA; C- Sinvastatina; D- CsA + Sinvastatina ; E- CsA 30 dias + CsA + Sinvastatina 60 dias (H.E. 200x).

4.2- FK506 e Sinvastatina

Avaliação Bioquímica – período de 15 dias

A Figura 17 (Painéis A, B e C) mostra as comparações das concentrações sangüíneas de Ca^{++} , fósforo e da atividade de ALP respectivamente.

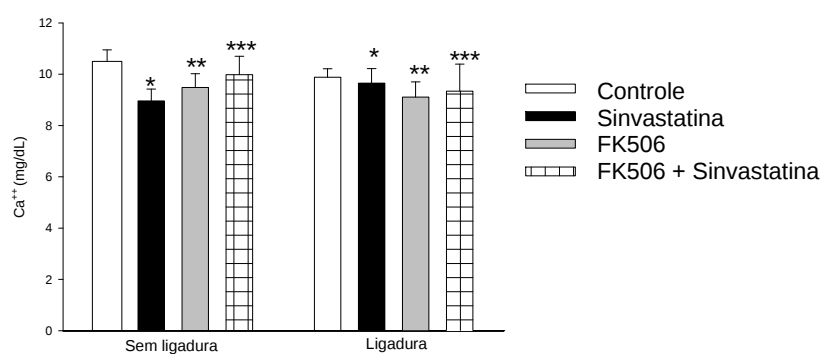
Cálcio e Fósforo:

Com relação aos níveis sangüíneos de Ca^{++} e fósforo, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos tratados, tanto nos grupos que receberam indução de doença periodontal quanto nos que não receberam, quando comparados aos seus respectivos controles (NaCl e ligadura respectivamente) (Painéis A e B).

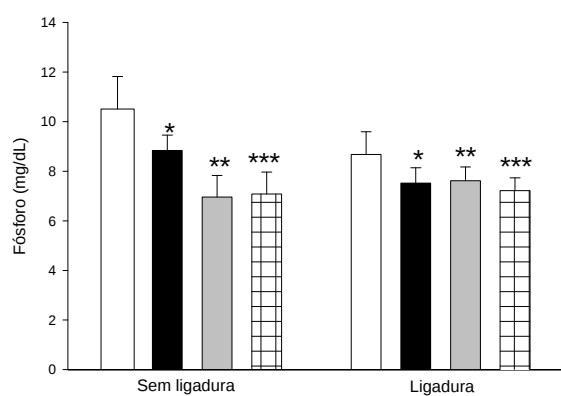
ALP:

Já com relação aos níveis de ALP, nos grupos que não receberam indução de doença periodontal, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos ratos tratados com Sinvastatina e FK506 e um aumento significativo ($p < 0,05$) nos ratos tratados com FK506 + Sinvastatina. Quando submetidos a doença periodontal houve um aumento significativo ($p < 0,05$) em todos os grupos tratados em relação ao grupo que recebeu somente doença periodontal (Painel C).

A



B



C

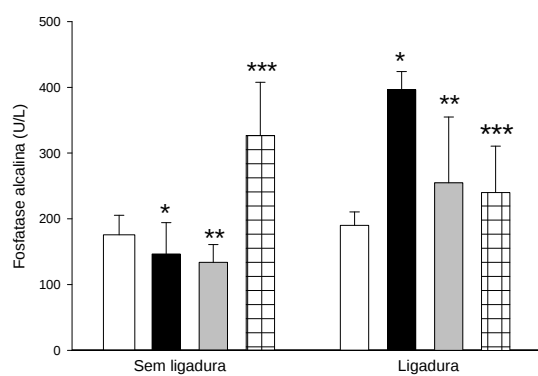


FIGURA 17 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- Nível sérico de cálcio; B- Nível sérico de fósforo e C- Atividade de fosfatase alcalina nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a FK506 e/ou Sinvastatina por um período de 15 dias.

*, **, *** representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0.05$).

ELISA IL-1 β e PGE2 - período 15 dias

A Figura 18 (Painéis A e B) mostra as concentrações de IL-1- β e PGE-2 respectivamente.

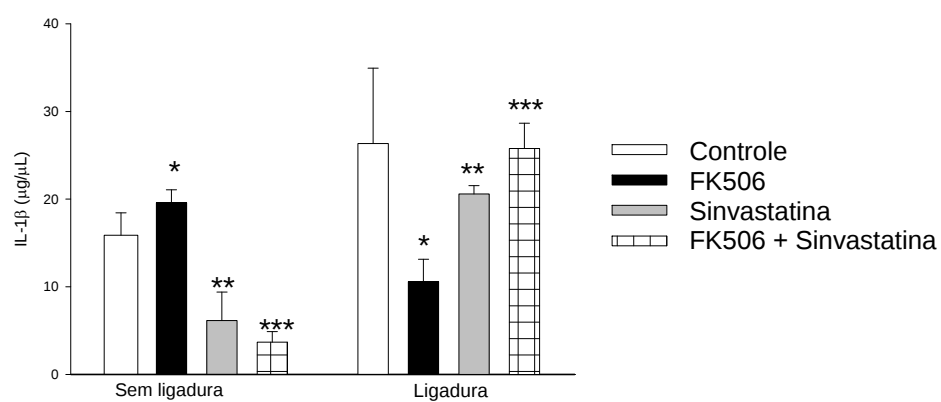
IL-1 β :

As concentrações de IL-1 β aumentaram significativamente ($p < 0,05$) nos ratos tratados com FK506 e tiveram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos grupos tratados com Sinvastatina e FK506 + Sinvastatina, quando não submetidos a doença periodontal em relação ao controle. Porém, quando submetidos a doença periodontal, em todos os grupos tratados houve uma significativa diminuição ($p < 0,05$) em relação ao ratos com doença periodontal apenas (Painel A).

PGE2:

Com relação às concentrações de PGE2, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos tratados em relação aos seus controles (NaCl e ligadura, respectivamente), tanto nos grupos que foram quanto os que não foram submetidos a doença periodontal (Painel B).

A



B

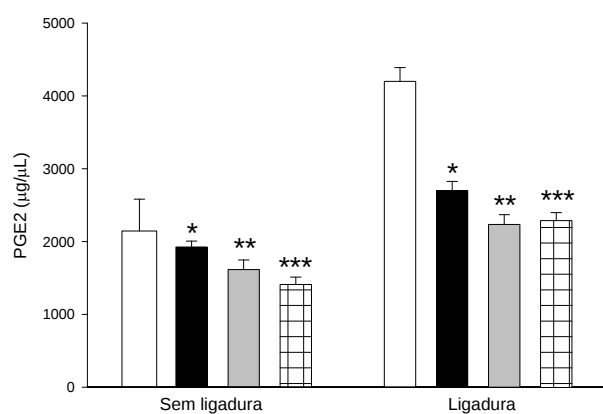


FIGURA 18 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- IL-1 β e B- PGE2, no tecido gengival de ratos nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a FK506 e/ou Sinvastatina por um período de 15 dias. *, **, ***, representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0.05$).

Estereometria do Processo Alveolar – período de 15 dias

A Figura 19 (Painéis A, B e C) mostra as porcentagens da densidade volumétrica de osso alveolar (BV/TV), osteoblasto (NOb/BS) e osteoclasto (NOc/BS), respectivamente. A Figura 20 (Painéis A11, B11, C11 e D11 e A12, B12, C12 e D12) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Controle; B- FK506; C- Sinvastatina; D- FK506 + Sinvastatina e a Figura 21 (Painéis A13, B13, C13 e D13 e A14, B14, C14 e D14) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + FK506; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + FK506 + Sinvastatina.

Com relação a BV/TV e NOb/BS, os grupos tratados, quando não submetidos a indução de doença periodontal, permanecem de modo semelhante ao controle. No entanto, quando submetidos a doença periodontal, ocorre um aumento significativo ($p < 0,05$) na BV/TV e na NOb/BS em todos os grupos tratados em relação ao grupo com doença periodontal apenas, sendo que entre estes grupos tratados não ocorre nenhuma alteração (Painéis A e B).

Com relação a NOc/BS, os grupos tratados, quando não submetidos a indução de doença periodontal, permanecem de modo semelhante ao controle. No entanto, quando submetidos a doença periodontal, ocorre uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos tratados em relação ao grupo com doença periodontal apenas (Painel C).

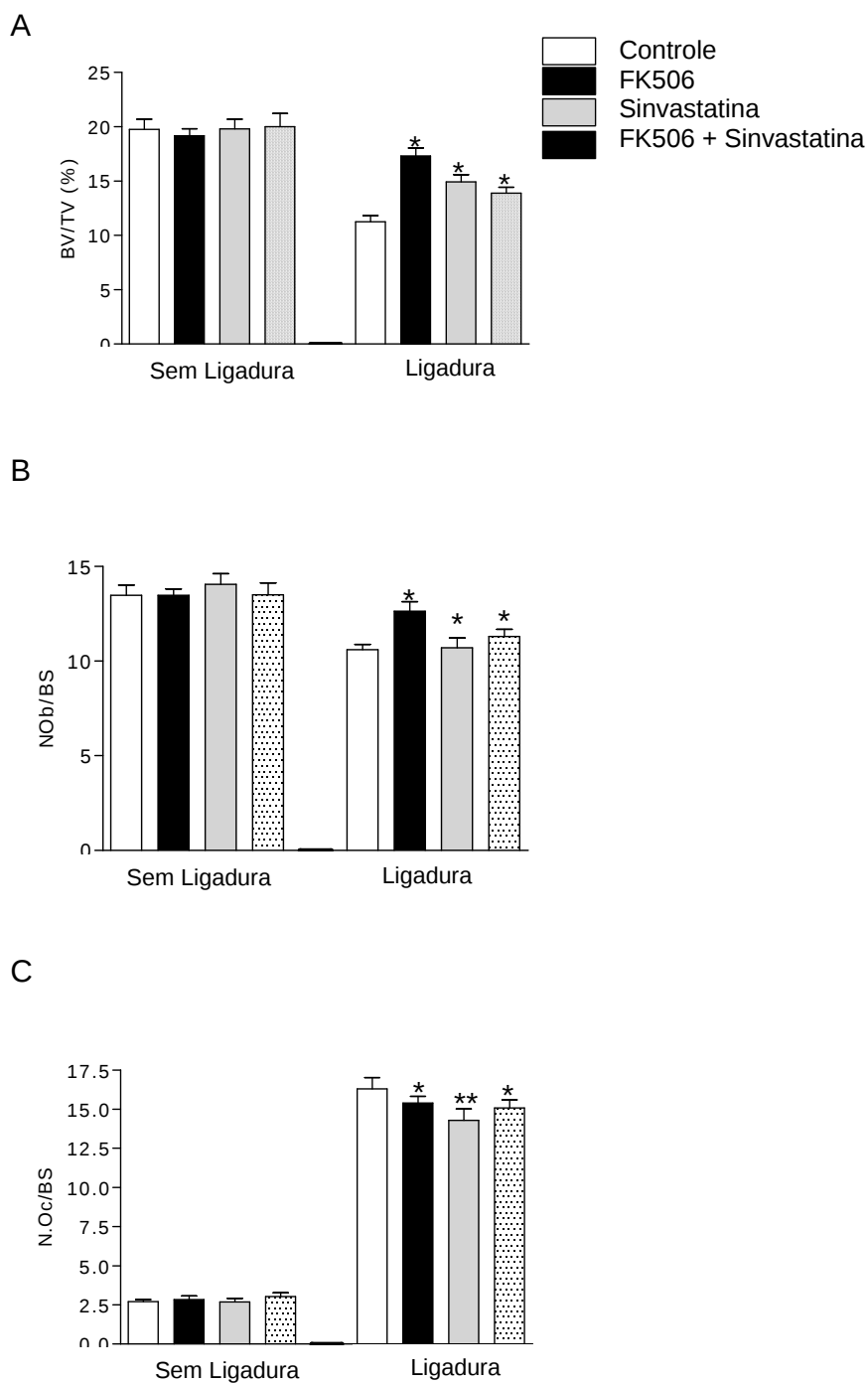


FIGURA 19 - Densidade volumétrica de: A- Osso alveolar; B- Osteoblastos e C- Osteoclastos da região vestibular, lingual e apical/interradicular de primeiro molar inferior de ratos no período de tratamento de 15 dias. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. Os resultados são expressos em porcentagem.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre as médias nos grupos ($P < 0.05$).

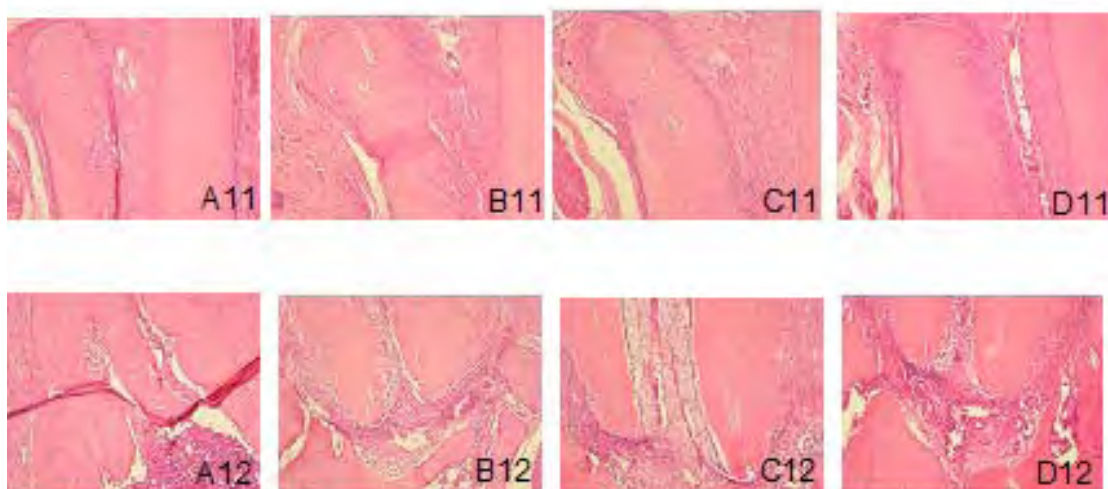


FIGURA 20 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A11, B11, C11 e D11) e na região apical/interradicular (A12, B12, C12 e D12), após 15 dias de período experimental, nos grupos: A- Controle; B- FK506; C- Sinvastatina; D- FK506 + Sinvastatina (H.E. 200x).

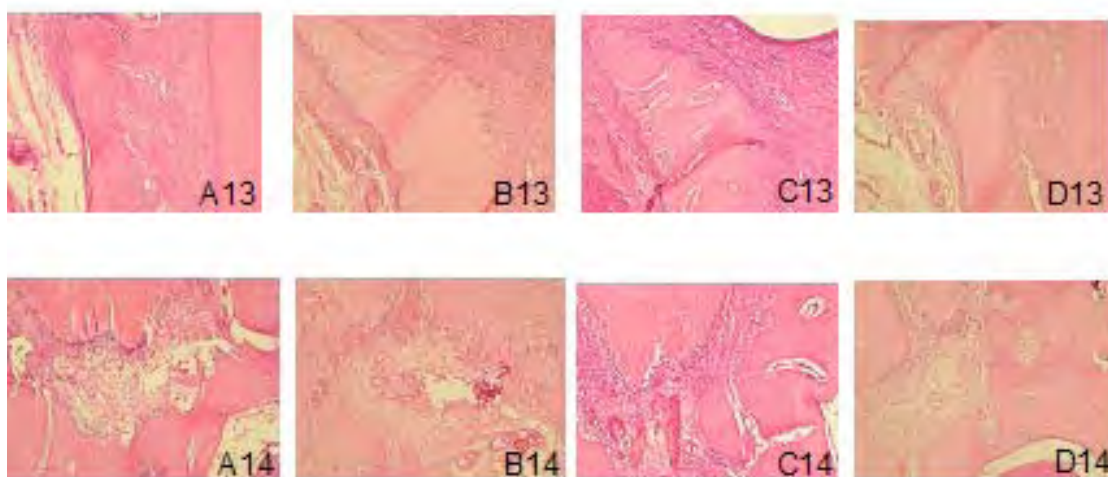


FIGURA 21 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A13, B13, C13 e D13) e na região apical/interradicular (A14, B14, C14 e D14), após 15 dias de período experimental, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + FK506; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + FK506 + Sinvastatina (H.E. 200x).

Avaliação Bioquímica – período de 30 dias

A Figura 22 (Painéis A, B e C) mostra as comparações das concentrações sanguíneas de Ca^{++} , fósforo e da atividade de ALP respectivamente.

Cálcio:

Com relação aos níveis séricos de Ca^{++} , quando não submetidos a doença periodontal, ocorre uma diminuição significativa ($p<0,05$) em todos os grupos tratados em relação ao controle, sendo que os grupos FK506 e Sinvastatina não são diferentes. Já quando submetidos a doença periodontal, ocorre um aumento significativo ($p<0,05$) de todos os grupos tratados em relação ao controle somente com doença periodontal (Painel A).

Fósforo:

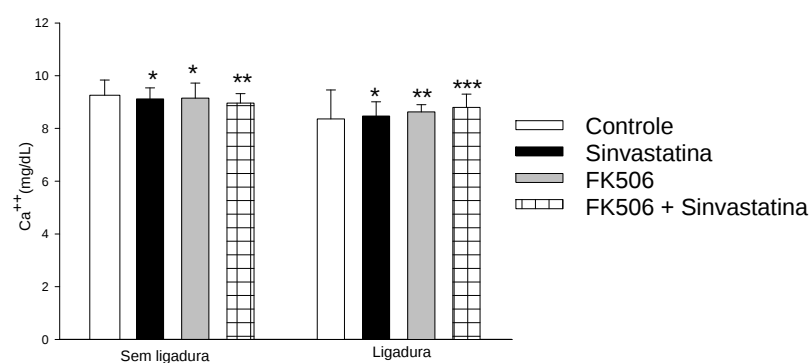
Nos níveis sanguíneos de fósforo, quando não submetidos a doença periodontal, também ocorre uma significativa diminuição ($p<0,05$) nos grupos tratados em relação ao controle. Porém, quando submetidos a doença periodontal, ocorre uma diminuição ($p<0,05$) nos grupos tratados com FK506 e Sinvastatina e um aumento ($p<0,05$) no grupo tratado com FK506 + Sinvastatina em relação ao controle com doença periodontal apenas (Painel B).

ALP:

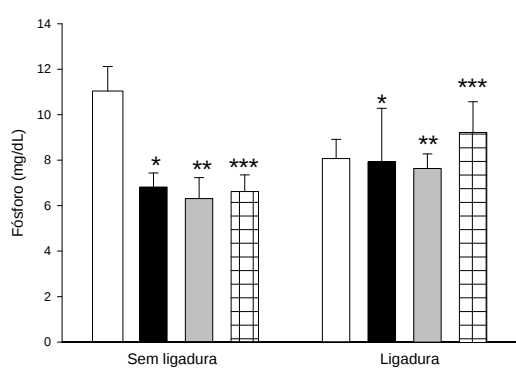
Com relação a ALP, quando não submetidos a indução de doença periodontal, ocorre um aumento ($p<0,05$) no grupo tratado com FK506, uma diminuição ($p<0,05$) no grupo tratado com Sinvastatina e o grupo FK506 + Sinvastatina não se altera em relação ao controle. Quando submetidos a doença

periodontal, ocorre um significativo aumento ($p < 0,05$) nos grupos tratados com FK506 e Sinvastatina e uma diminuição ($p < 0,05$) no grupo FK506 + Sinvastatina em relação ao controle somente com doença periodontal (Painel C).

A



B



C

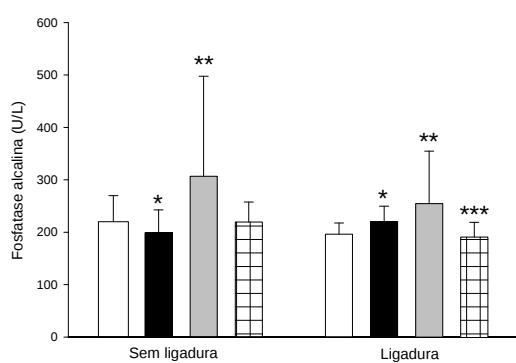


FIGURA 22 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- Nível sérico de cálcio; B- Nível sérico de fósforo e C- Atividade de fosfatase alcalina nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a FK506 e/ou Sinvastatina por um período de 30 dias.

*, **, *** representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0.05$).

Expressão de NOS (RT-PCR) – no período de 30 dias

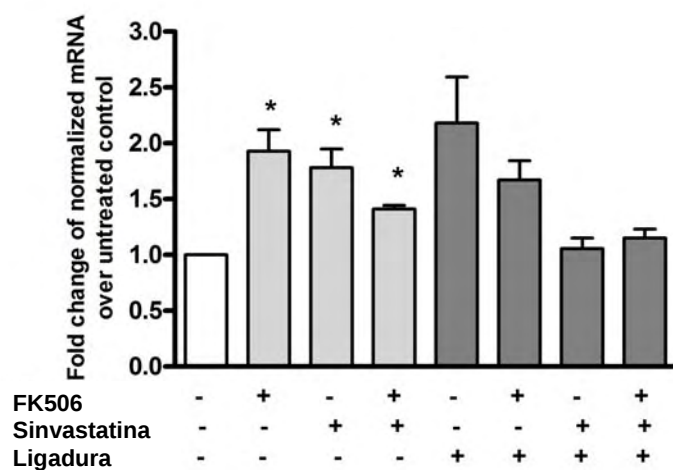
A Figura 23 (Painéis A e B) mostra a expressão de mRNA de eNOS e iNOS respectivamente.

mRNA eNOS:

Com relação a expressão de mRNA de eNOS, os grupos de ratos sem indução de doença periodontal e tratados com FK506, Sinvastatina e FK506 + Sinvastatina mostraram um significativo aumento comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). Ao contrário destes resultados, houve uma tendência (não significativa) de diminuição da expressão de eNOS nos ratos com indução de doença periodontal, independentemente do tratamento com drogas (Painel A).

Com relação ao mRNA de iNOS, houve um significativo aumento na sua expressão nos ratos sem doença periodontal e tratados com FK506 + Sinvastatina ($p < 0,05$) e apenas uma tendência de aumento nos ratos tratados com FK506 e Sinvastatina. Houve também uma tendência de diminuição de iNOS nos ratos submetidos a doença periodontal somente, entretanto, houve uma tendência de aumento na sua expressão quando os ratos com doença periodontal foram submetidos também ao tratamento com FK506 e com Sinvastatina e um aumento significativo ($p < 0,05$) nos ratos com ligadura + FK506 + Sinvastatina em relação aos ratos somente com ligadura (Painel B).

A



B

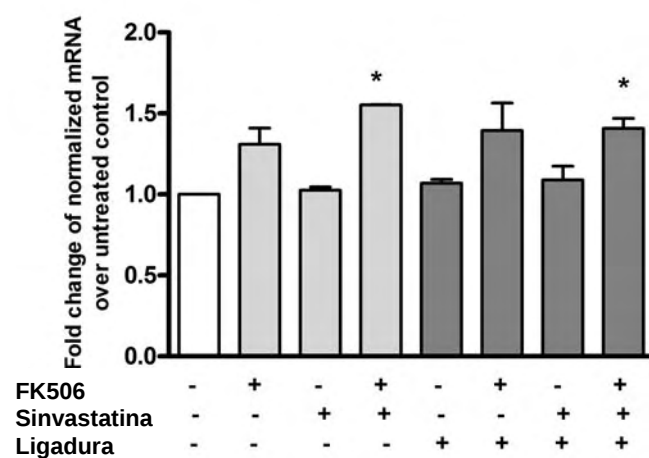


FIGURA 23 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- eNOS and B- iNOS, no tecido gengival de ratos nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associado ou não a FK506 e/ou Sinvastatina por um período de 30 dias.

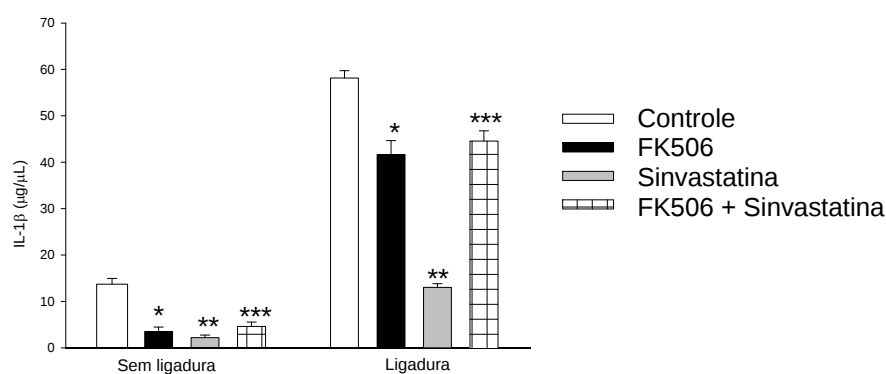
* Representa diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos ($P < 0.05$).

ELISA IL-1 β e PGE2 – período de 30 dias

A Figura 24 (Painéis A e B) mostra as concentrações de IL-1- β e PGE-2 respectivamente.

Com relação às concentrações de IL-1 β e PGE2, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos grupos tratados em relação aos seus respectivos controles (NaCl e Ligadura, respectivamente), tanto nos grupos que não foram submetidos a doença periodontal, quanto nos que foram (Painéis A e B).

A



B

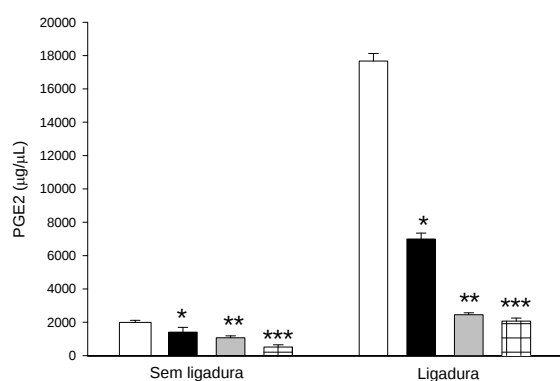


FIGURA 24 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- IL-1 β e B- PGE2, no tecido gengival de ratos nos grupos submetidos ou não a doença periodontal e associados ou não a FK506 e/ou Sinvastatina por um período de 30 dias.

*, **, ***, representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos com e sem ligadura separadamente ($P < 0,05$).

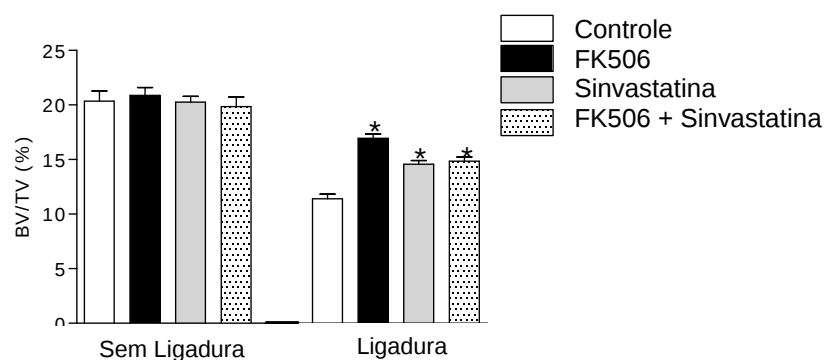
Estereometria do Processo Alveolar – período de 30 dias

A Figura 25 (Painéis A, B e C) mostra as porcentagens da densidade volumétrica de osso alveolar (BV/TV), osteoblasto (NOb/BS) e osteoclasto (NOc/BS), respectivamente. A Figura 26 (Painéis A15, B15, C15 e D15 e A16, B16, C16 e D16) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A-Controle; B- FK506; C- Sinvastatina; D- FK506 + Sinvastatina e a Figura 27 (Painéis A17, B17, C17 e D17 e A18, B18, C18 e D18) representa o osso alveolar na região vestibular e apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + FK506; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + FK506 + Sinvastatina.

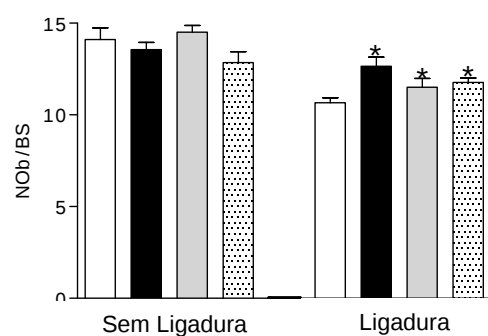
Com relação a BV/TV e a NOb/BS, não houve alterações nos grupos tratados em relação ao grupo controle, quando os ratos não foram submetidos a doença periodontal. Porém, quando submetidos a doença periodontal houve um aumento ($p<0,05$) na BV/TV e na NOb/BS em todos os grupos tratados em relação aos ratos que receberam ligadura somente, sendo que entre eles não houve diferença significativa (Painéis A e B).

Com relação a NOc/BS, não houve alterações nos grupos tratados em relação ao grupo controle, quando os ratos não foram submetidos a doença periodontal. Porém, quando submetidos a doença periodontal houve uma diminuição ($p<0,05$) em todos os grupos tratados em relação ao grupo com ligadura apenas, sendo que o grupo tratado com Sinvastatina teve uma maior diminuição na NOc/BS, ($p<0,05$) quando comparado aos grupos tratados com FK506 e FK506 + Sinvastatina (Painel C).

A



B



C

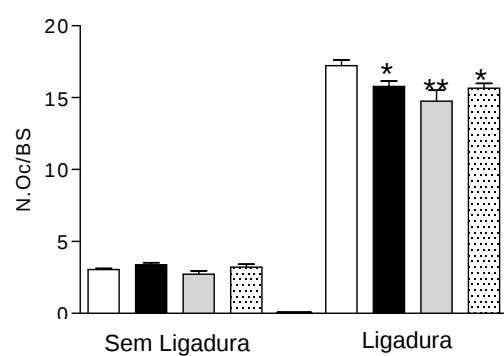


FIGURA 25 - Densidade volumétrica de: A- Osso alveolar; B- Osteoblastos e C- Osteoclastos da região vestibular, lingual e apical/interradicular de primeiro molar inferior de ratos no período de tratamento de 30 dias. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. Os resultados são expressos em porcentagem.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre as médias nos grupos ($P < 0.05$).

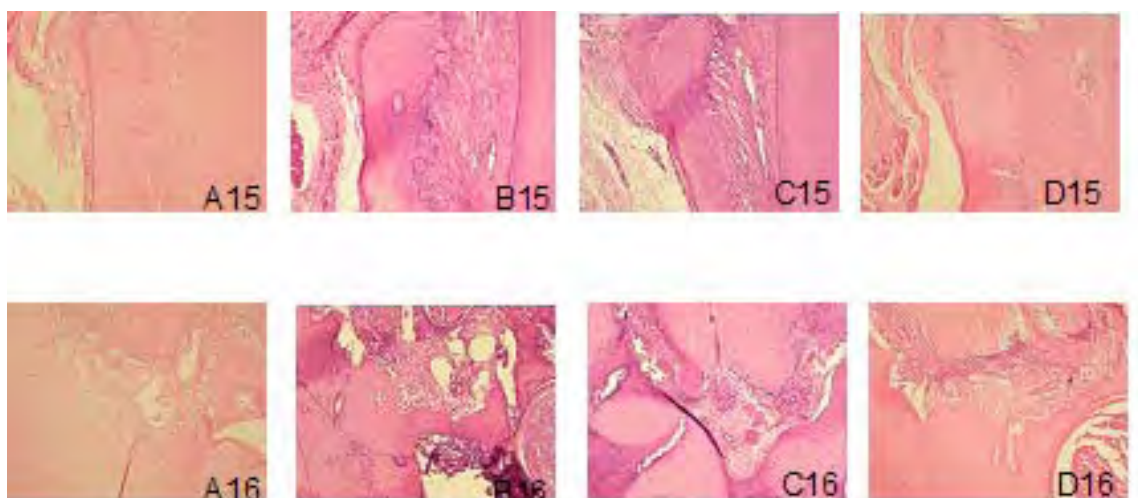


FIGURA 26 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A15, B15, C15 e D15) e na região apical/interradicular (A16, B16, C16 e D16), após 30 dias de período experimental, nos grupos: A- Controle; B- FK506; C- Sinvastatina; D- FK506 + Sinvastatina (H.E. 200x).

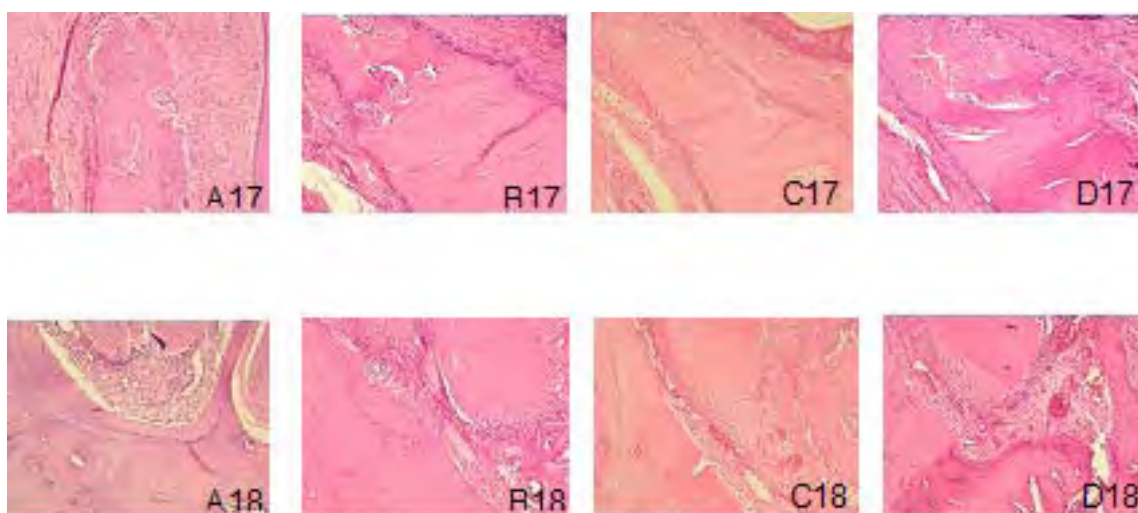


FIGURA 27 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A17, B17, C17 e D17) e na região apical/interradicular (A18, B18, C18 e D18), após 30 dias de período experimental, nos grupos: A- Ligadura; B- Ligadura + FK506; C- Ligadura + Sinvastatina; D- Ligadura + FK506 + Sinvastatina (H.E. 200x).

Avaliação Bioquímica – período de 60 dias

A Figura 28 (Painéis A, B e C) mostra as comparações das concentrações sanguíneas de Ca^{++} , fósforo e da atividade de ALP respectivamente.

Cálcio:

Com relação aos níveis sanguíneos de Ca, houve um aumento ($p < 0,05$) nos grupos tratados com Sinvastatina e FK506 + Sinvastatina e uma diminuição ($p < 0,05$) nos grupos tratados com FK506 e FK506 30 dias + FK506 + Sinvastatina 60 dias em relação ao grupo controle (Painel A).

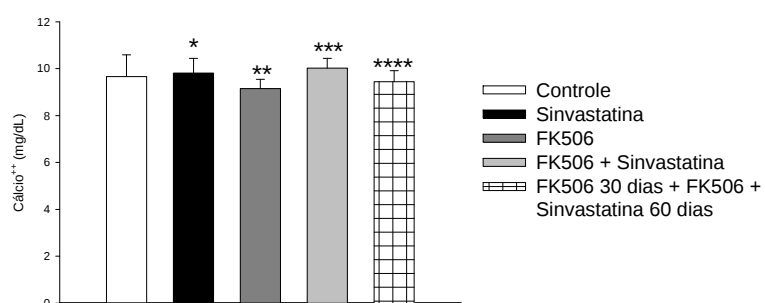
Fósforo:

Nos níveis de fósforo, houve um aumento ($p < 0,05$) nos grupos tratados com Sinvastatina e FK506 30 dias + FK506 + Sinvastatina 60 dias e uma diminuição ($p < 0,05$) nos grupos tratados com FK506 e FK506 + Sinvastatina, em relação ao grupo controle (Painel B).

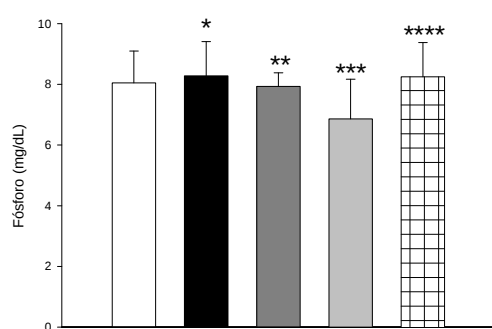
ALP:

Com relação aos níveis séricos de ALP, ocorreu uma significativa diminuição ($p < 0,05$) apenas no grupo tratado com Sinvastatina, enquanto que nos outros grupos tratados, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (Painel C).

A



B



C

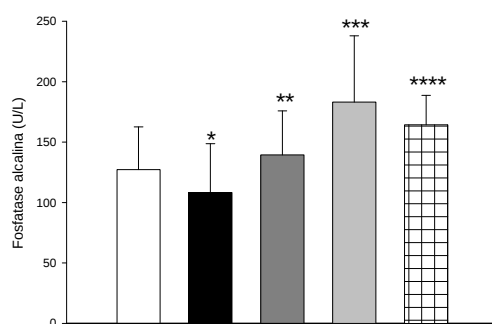


FIGURA 28 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- Nível sérico de cálcio; B- Nível sérico de fósforo e C- Atividade de fosfatase alcalina nos grupos por um período de 60 dias.

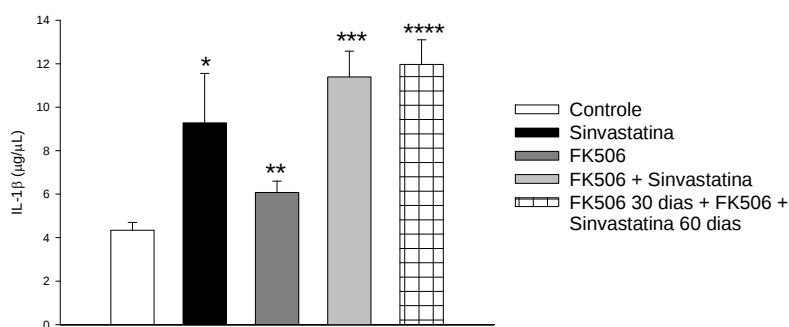
*, **, ***, **** representam diferença estatisticamente significante entre as medias nos grupos ($P < 0.05$).

ELISA IL-1 β e PGE2 – período de 60 dias

A Figura 29 (Painéis A e B) mostra as concentrações de IL-1- β e PGE-2 respectivamente.

Com relação às concentrações de IL-1 β , houve um aumento significativo ($p < 0,05$) em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle (Painel A), enquanto que nas concentrações de PGE2 ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle (Painel B).

A



B

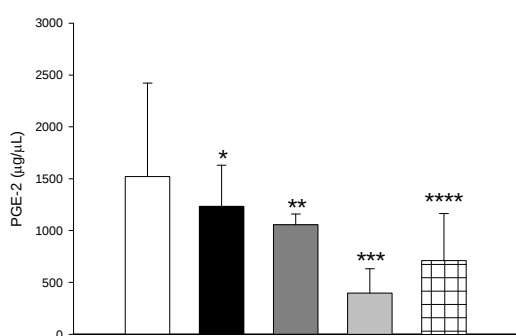


FIGURA 29 - Medidas (médias $\pm$ desvio padrão) de: A- IL-1 β e B- PGE2, no tecido gengival de ratos nos grupos por um período de 60 dias.

*, **, ***, **** representam diferença estatisticamente significativa entre as medias nos grupos ($P < 0.05$).

Estereometria do Processo Alveolar – período de 60 dias

A Figura 30 (Painéis A, B e C) mostra as porcentagens da densidade volumétrica de osso alveolar (BV/TV), osteoblasto (NOb/BS) e osteoclasto (NOc/BS), respectivamente. A Figura 31 (Painéis A19, B19, C19, D19 e E19 e A20, B20, C20, D20 e E20) representa o osso alveolar na região vestibular e na região apical/interradicular, respectivamente, nos grupos: A- Controle; B- FK506; C-Sinvastatina; D- FK506 + Sinvastatina ; E- FK506 30 dias + CsA + Sinvastatina.

Após 60 dias de tratamento, observamos que não houve alterações nas BV/TV, NOb/BS e NOc/BS, nos ratos tratados com FK506 apenas, Sinvastatina apenas e FK506 associado ao tratamento com Sinvastatina, quando comparados ao grupo controle (Painéis A, B e C).

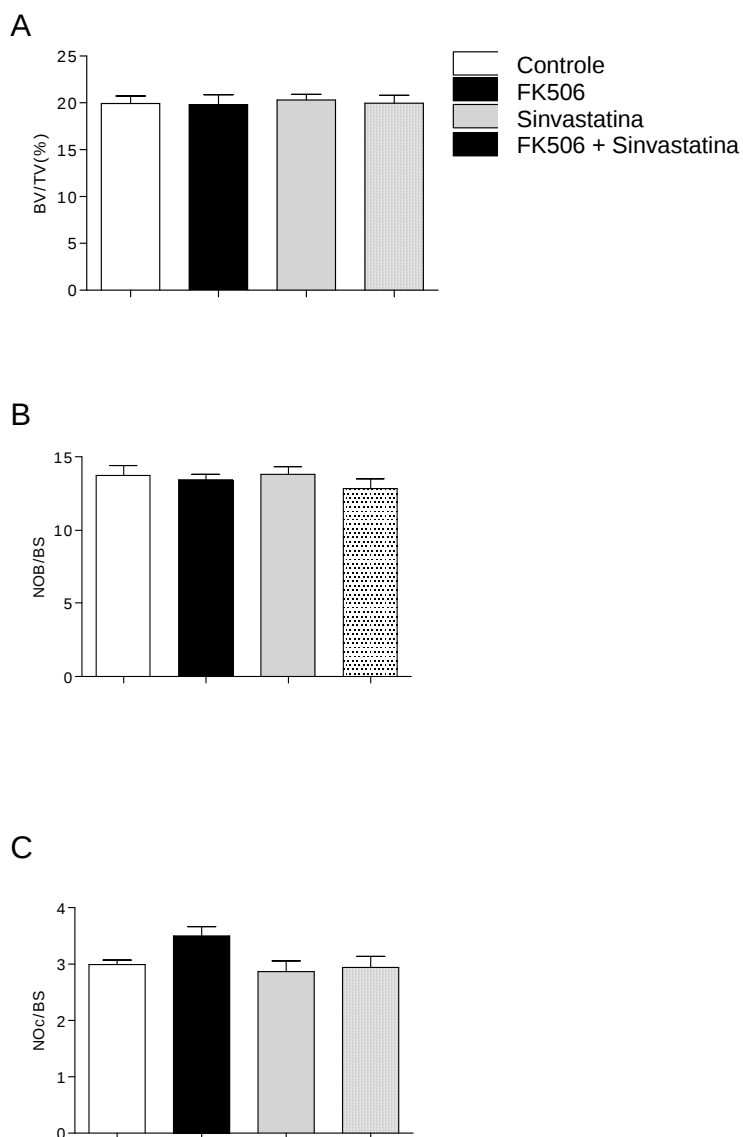


FIGURA 30 - Densidade volumétrica de: A- Osso alveolar; B- Osteoblastos e C- Osteoclastos da região vestibular, lingual e apical/interradicular de primeiro molar inferior de ratos no período de 60 dias. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão. Os resultados são expressos em porcentagem.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre as médias nos grupos ($P < 0.05$).

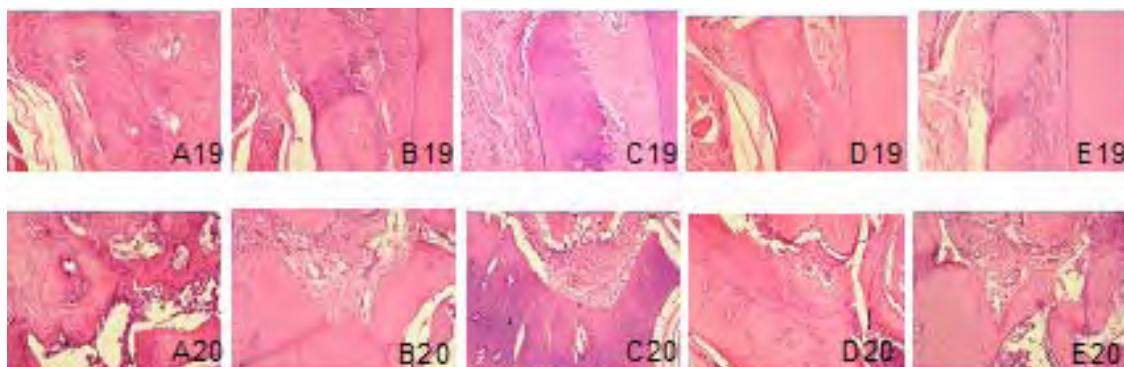


FIGURA 31 - Figuras mostrando o osso alveolar na região vestibular (A19, B19, C19, D19 e E17) e na região apical/interradicular (A20, B20, C20, D20 e E20), após 60 dias de período experimental, nos grupos: A- Controle; B- FK506; C-Sinvastatina; D- FK506 + Sinvastatina ; E- FK506 30 dias + FK506 + Sinvastatina 60 dias (H.E. 200x).

5 DISCUSSÃO

A escolha da sinvastatina entre os inibidores de HMG-CoA redutase para o estudo foi realizada, uma vez que as estatinas apresentam efeitos variados no osso, sendo que a lovastatina e a pravastatina exibem um menor efeito e a sinvastatina, atorvastatina e a cerivastatina exercem efeitos maiores². Segundo Mundy et al.⁴¹ (1999) algumas estatinas estimulam a formação óssea quando injetadas subcutaneamente sobre a calvária de ratos, aumentando também a expressão de mRNA de BMP-2 em osteoblastos, sendo corroborado por estudos *in vitro* *que* confirmaram este efeito positivo na formação óssea⁶⁴ e estudos clínicos focados em doenças ósseas, especialmente osteoporose^{39,66}. Este efeito da sinvastatina poderia ser interessante na regeneração de defeitos periodontais, especialmente na regeneração dos tecidos duros, que objetivou o nosso estudo em avaliar o efeito da sinvastatina no osso alveolar de ratos submetidos ou não a periodontite experimental, associado ao tratamento com CsA ou FK506.

Inicialmente, foi possível observar que no período curto de 15 dias, os marcadores bioquímicos Ca^{++} e fósforo se comportaram de maneira semelhante, expressando uma diminuição em relação ao controle e principalmente quando associado à indução de doença periodontal aos tratamentos com CsA, Sinvastatina e CsA + Sinvastatina. Já no período de 30 dias estes marcadores se comportaram de maneira significativamente diferente, ocorrendo um aumento do nível sérico de Ca^{++} no grupo tratado com Sinvastatina e ligadura e um aumento do nível sérico de fósforo no grupo tratado com Ligadura + CsA +

Sinvastatina, sendo que nos outros tratamentos, tanto o nível sérico de Ca^{++} quanto o nível sérico de fósforo, se comportaram de maneira semelhante ao período de 15 dias.

Ainda associado ao nível sérico de Ca^{++} nos grupos tratados com CsA associada ou não a doença periodontal em ambos os períodos, os resultados corroboram com os achados de Nassar et al.⁴³ (2004), os quais relatam que esta diminuição poderia ser um efeito não-específico da CsA devido a um aumento da excreção no fígado. Por outro lado, a Sinvastatina, quando associada à periodontite experimental, diminui no período de 15 dias e aumenta em 30 dias. Este comportamento é suportado pela literatura, uma vez que Hwang et al.³⁰ (2004) relatam fortes evidências que a calciclina, uma proteína ligada ao cálcio, exerce papéis importantes como um mediador da sinvastatina induzindo efeitos anabólicos no osso. Enquanto Satoh et al.⁵⁴ (2001), indicam em seus resultados que os inibidores de HMG-CoA redutase, como a sinvastatina, poderiam interromper a angiotensina II, que induz sinais de cálcio para a ativação de tirosina-quinase (Pyk2) nas células endoteliais de veias pulmonares.

Com relação ao fósforo que está levemente aumentado apenas no período de 30 dias quando submetidos à ligadura + CsA + Sinvastatina, a única hipótese sugerida é a do estudo de Khosroshahi et al.³⁸ (2007), que concluíram que pacientes transplantados renais com funções estáveis do enxerto podem ter níveis normais de fósforo e intactos de hormônio paratireóide.

Quando observamos os resultados de ALP, a CsA comporta-se de maneira oposta nos períodos de 15 e 30 dias. Em 15 dias, ocorre aumento de

ALP nos grupos tratados com CsA com ou sem doença periodontal induzida, sendo que no período de 30 dias, a sua diminuição é sugerida como uma anormalidade metabólica por Nassar et al.⁴³ (2004), o que poderia facilitar a presença de osteoporose. A Sinvastatina demonstra aumento apenas quando associada à indução de doença periodontal, tanto no período de 15 dias como no 30 dias. Este efeito pode ser importante, principalmente quando na presença de doença periodontal, uma vez que estudos têm demonstrado que as estatinas têm um efeito estimulatório na expressão de mRNA de osteocalcina em cultura primária de osteoblastos humanos preparados de fragmentos de ossos do fêmur⁴⁵ e podem promover diferenciação de osteoblastos². Estas influências benéficas das estatinas no metabolismo ósseo podem levá-las a ser um agente anabólico efetivo para o tratamento de osteoporose.

Observando os efeitos tanto da CsA quanto da Sinvastatina no osso alveolar através da densidade volumétrica de osso alveolar (BV/TV) e número de osteoblastos (NOb/BS) e osteoclastos (NOc/BS) e associando às concentrações de IL1- β e PGE2, notamos que no período de 15 dias, ocorre uma diminuição de IL-1 β e PGE2 em todos os tratamentos, associados ou não a indução de doença periodontal, com a Sinvastatina promovendo quase sempre uma maior diminuição destas citocinas quando comparado ao tratamento com CsA. No entanto, observa-se uma diminuição significativa na BV/TV e no NOb/BS no tratamento com CsA associado ou não a periodontite experimental, enquanto que os tratamentos com Sinvastatina e CsA + Sinvastatina, na presença ou não de doença periodontal induzida, promovem efeito semelhante

ao observado no grupo controle. No período de 30 dias, observa-se um aumento nas concentrações de IL-1 β e PGE2 apenas no grupo tratado com CsA sem doença periodontal, entretanto quando induzida a doença periodontal, apesar de haver diminuição destas citocinas no tratamento com CsA, o tratamento nos grupos com Sinvastatina e, principalmente, CsA + Sinvastatina diminuem ainda mais estas concentrações. Assim também podemos observar com relação à BV/TV e o NOb/BS, que no período de 30 dias parecem diminuir consideravelmente, nos grupos com ligadura e com CsA + ligadura, enquanto nos tratamentos com Sinvastatina e CsA + Sinvastatina associados ou não a periodontite experimental, parecem começar a exercer um efeito protetor, principalmente sobre a CsA.

Vários estudos demonstram que os ossos em geral, bem como o processo alveolar são reabsorvidos pela CsA, tendo um desequilíbrio na homeostase, induzindo perda óssea¹³, embora os efeitos no metabolismo ósseo sejam ainda controversos. Spolidorio et al.⁵⁷ (2004) demonstram que com CsA ocorreu aumento na densidade volumétrica de osteoclastos (NOc/BS) e diminuição na BV/TV nos períodos iniciais e manteve-se em longos períodos. Além disso, outros estudos têm demonstrado que a PGE2 diminui no tratamento com CsA quando associado à periodontite experimental⁷. As mesmas características têm acontecido com outras interleucinas, como a IL-1 β , que na presença de CsA e doença periodontal induzida diminui a sua produção¹⁵.

Como já citado anteriormente, quando associado ao uso de sinvastatina, estas interleucinas diminuem significativamente em relação aos grupos controle

e CsA, demonstrando que as estatinas suprimem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e PGE2. Estes resultados estão suportados por estudos em humanos, sugerindo que as estatinas diminuem o número de células inflamatórias em placas ateroscleróticas⁹.

Analisando os dados do FK506 associado ou não a Sinvastatina em ratos com e sem doença periodontal induzida, observamos que aos 15 dias, os marcadores bioquímicos Ca⁺⁺, fósforo e ALP no tratamento com FK506 apenas e Sinvastatina somente estão diminuídos quando não associados à periodontite experimental. Já com relação à presença de doença periodontal induzida, apenas os níveis de ALP aumentam nestes tratamentos. Aos 30 dias, observamos que na presença de doença periodontal induzida, tanto o nível sérico de Ca⁺⁺ quanto o nível sérico de ALP estão aumentados quando associados ao tratamento com FK506 ou Sinvastatina apenas.

Interessantemente, o FK506 também aumenta os níveis de ALP, um marcador de formação óssea, nos grupos não submetidos à periodontite experimental, tanto aos 30 dias quanto aos 60 dias. Já os níveis séricos de Ca⁺⁺ e de fósforo diminuem aos 30 e 60 dias nos grupos não submetidos a periodontite experimental. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Goffin et al.²² (2002), o qual mostra um aumento de ALP num período de 3 meses, diminuição significativa de fósforo e diminuição não significativa de Ca⁺⁺, sugerindo que o FK506 em doses adequadas causaria um sucesso na imunossupressão com adequada função renal e simultaneamente manutenção

de massa óssea, sugerindo que o FK506 poderia afetar mais a atividade osteoblástica do que a osteoclástica.

Observando as concentrações de IL-1 β e PGE2, nos períodos de 15 e 30 dias, podemos observar que estas interleucinas estão significativamente aumentadas no tratamento com FK506 em comparação ao tratamento com Sinvastatina associados ou não a periodontite experimental, exceto a IL-1 β que demonstra concentração significativamente maior nos grupos tratados com Sinvastatina do que nos grupos tratados com FK506 quando submetidos à periodontite experimental no período de 15 dias.

Assim também podemos observar com relação à BV/TV e o NOb/BS, tanto no período de 15 quanto no período de 30 dias, não submetidos à periodontite experimental, que não ocorre alteração dos grupos tratados em relação ao controle. No entanto, quando submetidos à periodontite experimental, o tratamento com FK506 apresenta-se demonstrando sempre maior BV/TV e NOb/BS do que o controle com ligadura e uma tendência de aumento em relação aos grupos tratados com Sinvastatina e FK506 + Sinvastatina + Ligadura.

Estes resultados relacionados ao FK506 corroboram com o estudo de Guimarães et al.²³ (2007) que demonstram que o tratamento com FK506 diminui a atividade das mieloperoxidases (MPO) e PGE2 em modelos de ratos. Sendo assim, uma possível hipótese para o papel do FK506 na defesa do hospedeiro durante a periodontite induzida por ligadura, pode ser entendida em parte, devido à diminuição na resposta inflamatória aguda. Por outro lado, o FK506

promove elevação nos níveis séricos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , associados com a periodontite experimentalmente induzida. Isto pode ser postulado que algumas das citocinas inflamatórias produzidas na doença periodontal são induzidas pela ativação de células Th1 e Th2 e a subsequente interação de células T ativadas com células epiteliais monócitos/macrófagos, células endoteliais e fibroblastos.

Observando os resultados obtidos no tratamento com FK506 e com Sinvastatina associados ou não a doença periodontal induzida constatou-se de um modo geral, que os tratamentos com os medicamentos separadamente apresentaram um efeito protetor benéfico sobre o osso alveolar, uma vez que ambos parecem promover um efeito anabólico no metabolismo ósseo, porém não demonstrando um melhor efeito significativo quando associados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os objetivos propostos deste estudo e suas limitações, consideramos que:

- A Sinvastatina parece promover um efeito protetor no osso alveolar de ratos submetidos a periodontite experimental, principalmente por diminuir as concentrações de IL-1 β e PGE2 e prevenir a perda da densidade volumétrica de osso alveolar e osteoblasto.

- Quando associada ao tratamento com CsA ou FK506, observamos que a Sinvastatina parece promover um bom efeito protetor sobre a CsA, principalmente na presença de doença periodontal induzida, enquanto que com o FK506, ela não mostrou este efeito, uma vez que o mesmo parece minimizar a progressão da doença periodontal em modelos animais.

7 REFERÊNCIAS *

- 1- Asberg A. Interactions between cyclosporin and lipid-lowering drugs. *Drugs* 2003;63:367-78.
- 2- Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci.* 2005;20:438-44.
- 3- Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec.* 1989;224:317-24.
- 4- Blanco-Colio LM, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Egido J.. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int.* 2003; 63: 12-23.
- 5- Cayco AV, Wysolmerski J, Simpson C, Mitnick MA, Gundberg C, Kliger A, et al. Posttransplant bone disease: Evidence for high bone resorption state. *Transplantation* 2000; 70: 1722-8.
- 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: 833-40.
- 7- Chang CT, Hung CC, Yang CW, Vandewalle A, Wu MS. Cyclosporine decreases prostaglandin E2 production in mouse medullary thick ascending limb cultured cells. *Transpl Int.* 2005; 18: 871-8.

* De acordo com a norma Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 8- Chen YH, Liang YX, Chen LQ, Liang JJ, Zhang J, Qiu J, et al. Prevention of diltiazem in tacrolimus-induced nephrotoxicity: experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87: 2235-7.
- 9- Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001; 103: 926-33.
- 10- Cunha-Cruz J, Saver B, Maupome G, Hujoel PP. Statin use and tooth loss in chronic periodontitis patients. *J Periodontol*. 2006; 77: 1061-6.
- 11- Cvetkovic M, Mann GN, Romero DF, Liang XG, Ma Y, Jee WS, Epstein S. The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation*. 1994; 57: 1231-7.
- 12- Debray D, Furlan V, Baudouin V, Houyel L, Lacaille F, Chardot C. Therapy for acute rejection in pediatric organ transplant recipient. *Paediatr Drugs*. 2003; 5: 81-93.
- 13- Dejardin A, Devogelaer JP, Goffin E. Alendronate versus calcitriol for prevention of bone loss after cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2306-8.
- 14- Desager JP, Horsmans Y. Clinical pharmacokinetics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet*. 1996; 31: 348-71.

- 15- Doller A, Akool el-S, Müller R, Gutwein P, Kurowski C, Pfeilschifter J, et al. Molecular mechanisms of cyclosporin A inhibition of the cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 581-92.
- 16- Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin – An update Review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral) in organ transplantation. *Drugs*. 2001; 61: 1957-2016.
- 17- Epstein S. Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. *J Bone Miner Res*. 1996; 11: 1-7.
- 18- Erben RG, Brunner KS, Breig B, Eberle J, Goldberg M, Hofbauer LC. Skeletal effects of cyclosporin A are gender related in rats. *Endocrinology*. 2003; 144: 40-9.
- 19- 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: 1105-10.
- 20- Fu E, Hsieh YD, Nieh S, Wikesjö UM, Liu D. Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. *J Periodontol*. 1999; 70: 189-94.
- 21- Ghisdal L, Bouchta NB, Broeders N, Crenier L, Hoang AD, Abramowicz D, et al. Conversion from tacrolimus to cyclosporine A for new-onset diabetes after transplantation: a single-centre experience in renal transplanted patients and review of the literature. *Transpl Int*. 2008; 21: 146-51.

- 22- Goffin E, Devogelaer JP, Lalaoui A, Depresseux G, De Naeyer P, Squifflet JP, et al. Tacrolimus (FK506) and low-dose steroid immunosuppression preserves bone mass after renal transplantation. *Transpl Int.* 2002; 15: 73-80.
- 23- Guimarães MR, Nassar PO, Andia DC, Nassar CA, Spolidorio DM, Rossa C Jr, et al. Protective effects of tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 882-8.
- 24- Hedman M, Neuvonen PJ, Neuvonen M, Holmberg C, Antikainen M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin in pediatric and adolescent cardiac transplant recipients on a regimen of triple immunosuppression. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75: 101-9.
- 25- Hibi T, Inoue N, Ogata H, Naganuma M. Introduction and overview: recent advances in the immunotherapy of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2003; 38 (suppl 15): 36-42.
- 26- Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of receptor activator of nuclear factor-kappa by ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 2355-63.
- 27- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology.* 1999; 140: 4382-9.

- 28- Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. *Oral Dis.* 2006; 12: 85-101.
- 29- Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006; 288: 1243-9.
- 30- Hwang R, Lee EJ, Kim MH, Li SZ, Jin YJ, Rhee Y, et al. Calcyclin, a Ca^{2+} ion-binding protein, contributes to the anabolic effects of simvastatin on bone. *J Biol Chem.* 2004; 279: 21239-47.
- 31- Imamura R, Ichimaru N, Moriyama T, Shi Y, Namba Y, Nonomura N, et al. Long term efficacy of simvastatin in renal transplant recipients treated with cyclosporine or tacrolimus. *Clin Transplant.* 2005; 19: 616-21.
- 32- Inoue T, Kawamura I, Matsuo M, Aketa M, Mabuchi M, Seki J, et al. Lesser reduction in bone mineral density by the immunosuppressant, FK506, compared with cyclosporine in rats. *Transplantation.* 2000; 70: 774-9.
- 33 - Jacobson P, Uberti J, Davis W, Ratanatharathorn V. Tacrolimus: a new agent for the prevention of graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22: 217-25.
- 34- Jiang H, Fujitsu T, Sakuma S, Ogawa T, Tamura K, Fujii Y, et al. Immunosuppressive effects of FK 506 on rat renal allograft survival, in comparison with cyclosporine. *Transplant Proc.* 1995; 27: 367-9.
- 35- Jiang H, Takahara S, Takano Y, Li D, Kyo M, Valdivia LA, et al. Effect of FK 506 on heart allograft survival in highly sensitized recipient rat in comparison with cyclosporine. *Transplant Proc.* 1991; 23: 540-1.

- 36- Junqueira JC, Mancini MN, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci.* 2002; 44: 117-24.
- 37- Katz I, Li M, Joffe I, Stein B, Jacobs T, Liang XG, et al. Influence of age on cyclosporin A-induced alterations in bone mineral metabolism in the rat in vivo. *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 59-67.
- 38- Khosroshahi HT, Shoja MM, Azar SA, Tubbs RS, Safa J, Etemadi J, Ardalan MR. Calcium and phosphorus metabolism in stable renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant.*, 2007; 5: 670-2.
- 39- Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schlegel B, Jick H. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA.* 2000; 283: 3205-10.
- 40- Mengarelli A, Iori AP, Romano A, Cerretti R, Cerilli L, De Propriis MS, et al. One year cyclosporin prophylaxis graft-versus host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica.* 2003; 88:315-23.
- 41- Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999; 286(5446):1946-9.
- 42- Mundy GR. Statins and their potential for osteoporosis. *Bone.* 2001; 29: 495-7.
- 43- Nassar CA, Nassar PO, Abi Rached RS, Holzhausen M, Marcantonio E Jr, Spolidorio LC. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. *J Periodontal Res.* 2004; 39: 143-8.

- 44- Offermann G. Immunossuppression for long-term maintenance of renal allograft function. *Drugs*. 2004; 64: 1325-38.
- 45- Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, Takayanagi R. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 337-42.
- 46- Ohno T, Shigetomi M, Ihara K, Matsunaga T, Hashimoto T, Kawano H, et al. Skeletal reconstruction by vascularized allogenic bone transplantation: effects of statin in rats. *Transplantation*. 2003; 76: 869-71.
- 47- Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone*. 2004; 34: 609-18.
- 48- Papaccio G, Latronico MV, Graziano A, Lanza A, Pedullà M. Tacrolimus, but not cyclosporine A, significantly increases expresión of ICAM-1 and IFN-gamma in the NOD mouse. *J Cell Biochem Suppl*. 2001; (suppl 36):107-16.
- 49- Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system. *Bone Miner*. 1988; 4: 1-5.
- 50- Park KM, Hay JE, Lee SG, Lee YJ, Wiesner RH, Porayko MK, et al. Bone loss after orthotopic liver transplantation: FK 506 versus cyclosporine. *Transplant Proc*. 1996; 28: 1738-40.
- 51- Puzik A, Schultz C, Iblher P, Müller-Steinhardt M, Härtel C. Effects of ciclosporin A, tacrolimus and sirolimus on cytokine production in neonatal immune cells. *Acta Paediatr*. 2007; 96: 1483-9.

- 52- Ramos-Cebrián M, Torregrosa JV, Gutiérrez-Dalmau A, Oppenheimer F, Campistol JM. Conversion from tacrolimus to cyclosporine could improve control os posttransplant diabetes mellitus alter renal transplntation. *Transplant Proc.* 2007; 39: 2251-3.
- 53- Romero DF, Buchinsky FJ, Rucinski B, Cvetkovic M, Bryer HP, Liang XG, et al. Rapamycin: A bone sparing immunosuppressant? *J Bone Miner Res.* 1995; 10: 760-8.
- 54- Satoh K, Ichihara K, Landon EJ, Inagami T, Tang H.3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors block calcium-dependent tyrosine kinase Pyk2 activation by angiotensin II in vascular endothelial cells. involvement of geranylgeranylation of small G protein Rap1.*J Biol Chem.* 2001; 276: 15761-7.
- 55- Shen EC, Fu E, Hsieh YD. Effects of Cyclosporin A on dental alveolar bone: A histomorphometric study in rats. *J Periodontol.* 2001; 72: 659-65.
- 56- Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus: an update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs.* 1997; 54: 925-75.
- 57- Spolidorio LC, Spolidorio DM, Nassar PO, Nassar CA, Holzhausen M, Almeida OP. Influence of age on combined effects of Cyclosporin and Nifedipine on rat alveolar bone. *J Periodontol.* 2004; 75: 268-72.

- 58- Song C, Guo Z, Ma Q, Chen Z, Liu Z, Jia H, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308: 458-62.
- 59- Stempfle HU, Werner C, Siebert U, Assum T, Wehr U, Rambeck WA, et al. The role of tacrolimus (FK506) (FK 506)-based immunosuppression on bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: a prospective, longitudinal, randomized, double-blind trial with calcitriol. *Transplantation.* 2002; 73: 547-52.
- 60- Takadera T, Ohyashiki T. Caspase-dependent apoptosis induced by calcineurin inhibitors was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in cultured rat cortical cells. *Brain Res.* 2007; 1133: 20-6.
- 61- Valantine H. Cardiac Allograft Vasculopathy after heart trasnplantation: Risk factors and management. *J Heart Lung Transplant.* 2004; 23(5 suppl):S187-93.
- 62- van Mourik ID, Kelly DA. Imunossupresive drugs in pediatric liver transplantation. *Paediatr Drugs.* 2001; 3: 43-60.
- 63- Vaziri H, Naserhojjati-Roodsari R, Tahsili-Fahadan N, Khojasteh A, Mashhadi-Abbas F, et al. Effects of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *J Periodontol.* 2007; 78: 1561-7.

- 64- Yazawa H, Zimmermann B, Asami Y, Bernimoulin JP. Simvastatin promotes cell metabolism, proliferation, and osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2005; 76: 295-302.
- 65- Waid T; CRAF Study Group. Tacrolimus as secondary intervention vs. cyclosporine continuation in patients at risk for chronic renal allograft failure. *Clin Transplant*. 2005; 19: 573-80.
- 66- Wang PS, Solomon DH, Mogun H, Avorn J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA*. 2000; 283: 3211-6.
- 67- Wassef R, Cohen Z, Langer B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. *Transplantation*. 1985; 40: 489-93.
- 68- Williams JP, Thames AM 3rd, McKenna MA, McDonald JM. Differential effects of calmodulin and protein Kinase C antagonists on bone resorption and acid transport activity. *Calcif Tissue Int*. 2003; 73: 290-6.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 27 de março de 2008.

PATRICIA OEHLMEYER NASSAR