



**PATRÍCIA OEHLMEYER NASSAR**

**Avaliação do efeito da Ciclosporina A sobre o  
tecido ósseo de ratos com doença periodontal  
induzida por ligadura**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração - Periodontia.

*Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio*

ARARAQUARA  
2003

## 1. INTRODUÇÃO

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 inespecíficos (Dunn et al.<sup>28</sup>, 2001).

Na última década ocorreram avanços substanciais na compreensão dos eventos que controlam o sistema imune e dos efeitos seletivos das drogas, capazes de alterar ou modular a função imune. Um dos agentes mais comum utilizado na imunoterapia sistêmica é a ciclosporina-A (CsA) (Dunn et al.<sup>28</sup>, 2001).

Há alguns anos junto com o aprimoramento das técnicas cirúrgicas, a CsA propicia de modo incontestável avanços significativos no sucesso na inibição da rejeição de transplante. Essa premissa apóia-se no efeito inibidor marcante nos eventos iniciais da proliferação de linfócitos T, particularmente sobre a interleucina-2 (IL-2). Entretanto, a CsA produz efeitos secundários indesejáveis incluindo diretamente a boca. Neste caso o efeito indesejável mais evidente e estudado é o aumento gengival (Seymour et al.<sup>87</sup>, 2000).

As alterações gengivais induzidas por CsA tem sido observada tanto em humanos quanto em modelos experimentais "*in vivo*" e "*in vitro*" (Fu et al.<sup>38</sup>, 1999). Interações entre a CsA e os fibroblastos gengivais tem sido intensamente investigada e sugere-se que tais interações exercem um papel significativa na etiologia do crescimento gengival (Fu et al.<sup>37</sup>, 1997; Shen et al.<sup>88</sup>, 2001).

Por outro lado, há relatos na literatura que os ossos de maneira geral assim como o processo alveolar (Epstein<sup>30</sup>, 1996; Hofbauer et al.<sup>48</sup>, 1999; Hofbauer &

Heufelder<sup>49</sup>, 2000; Fu et al.<sup>39</sup>, 2001; Shen et al.<sup>88</sup>, 2001) e o cimento (Ayanoglou & Lesty<sup>2</sup>, 1997; Ayanoglou & Lesty<sup>3</sup>, 1997; Ayanoglou<sup>4</sup>, 1998; Ayanoglou<sup>5</sup>, 1999) são acometidos pela CsA desequilibrando sua homeostase.

Trabalhos experimentais objetivando estudar a ação da CsA sobre o osso têm mostrado resultados conflitantes (Del Pozo et al.<sup>26</sup>, 1995; Orcel et al.<sup>77</sup>, 1989; Klein et al.<sup>60</sup>, 1994). Em alguns protocolos terapêuticos indicados para pacientes transplantados, a CsA é administrada concomitantemente com outras drogas, com o objetivo de minimizar a rejeição ao enxerto. Dentre essas drogas, o uso de glicocorticóides é comum, e sabe-se que dentre seus efeitos indesejáveis está a perda óssea (Lukert & Raisz<sup>63</sup>, 1880). Nestes casos existem dificuldades para avaliar em humanos o efeito da CsA sobre o osso, proporcionando resultados controversos. Por outro lado, deve-se levar em consideração algumas variáveis tais como gênero e idade do paciente, dosagem e tempo de administração da droga e o biofilme dental (Klein et al.<sup>60</sup>, 1994). Trabalhos experimentais podem eliminar parte dessas variáveis. Na realidade, há poucos estudos relacionando perda óssea com a administração da CsA, tanto em humanos quanto em animais de laboratório.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1- Etiologia e Patogênese da Doença Periodontal

A doença periodontal é iniciada e mantida por fatores oriundos da microbiota presente no biofilme dental (Kahnberg et al.<sup>53</sup>, 1976). Estes microrganismos e seus produtos, em contato com o sulco gengival e no interior da bolsa, constituem o agente etiológico primário e, possivelmente, o único fator extrínseco da doença gengival e periodontal inflamatória (Page & Schroeder<sup>80</sup>, 1976).

Experimentos clássicos têm demonstrado que o acúmulo do biofilme dental induz uma resposta inflamatória dos tecidos gengivais de forma reprodutível (Löe et al. <sup>62</sup>, 1965) e que a remoção deste biofilme resulta no desaparecimento dos sinais clínicos de inflamação (Theilade et al. <sup>98</sup>, 1966).

Embora exista um consenso de que o fator etiológico primário das doenças periodontais seja o biofilme dental, muitas características significativas da doença não podem ser explicadas apenas por substâncias presentes no biofilme. Os mecanismos de defesa do hospedeiro também desempenham um papel essencial na patogênese da doença. Dados atualmente disponíveis mostram que as substâncias oriundas dos microrganismos presentes no biofilme dental são patogênicas porque têm a capacidade de ativar determinados mecanismos de defesa do hospedeiro que amplificam o dano tecidual. Algumas destas substâncias podem causar injúria direta às células e aos tecidos do hospedeiro. Outros componentes microbianos podem ativar o processo inflamatório ou o sistema imune celular e humoral, o que secundariamente danifica o periodonto. É

esta última via a responsável pela maior parte das injúrias periodontais (Page & Kornman<sup>79</sup>, 1997).

Desta maneira, a patogênese da doença periodontal provoca a destruição das estruturas de sustentação dental, como resultado da ação ineficaz e frustrada do sistema de defesa do hospedeiro em resposta ao acúmulo do biofilme. Este processo patogênico apresenta diferenças na extensão e severidade no próprio indivíduo (em diferentes sítios) e entre indivíduos diferentes; e as razões para isto são multifatoriais (Gonçalves<sup>42</sup>, 2002).

Independente da susceptibilidade do indivíduo, o biofilme dental desempenha um papel fundamental no processo patogênico, de modo que o único método universalmente aceito para interromper a destruição periodontal é o emprego de uma estratégia antimicrobiana, na qual a raspagem e alisamento radicular, assim como a manutenção de uma boa higiene oral são geralmente eficazes (Page & Kornman<sup>79</sup>, 1997).

A resposta do hospedeiro, exerce assim, um papel muito importante na patogênese da doença periodontal, por contribuir para o processo da doença ou por modular os efeitos produzidos pelas bactérias (Genco<sup>41</sup>, 1992). A resposta imune pode ser tanto protetora quanto destrutiva. Vários componentes do sistema imunológico são ativados na doença periodontal. Os neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos variam em número dependendo da condição da saúde ou doença dos tecidos. Os anticorpos locais, sistêmicos e o sistema complemento também participam na patogênese da doença periodontal. Estas variáveis do hospedeiro podem influenciar a colonização e invasão bacteriana, destruição tecidual, cicatrização e fibrose (Gonçalves<sup>42</sup>, 2002).

O biofilme dental é essencial para o processo patológico. A resposta do hospedeiro a esta agressão sofre grandes variações. A resposta imunológica é, portanto, a fonte mais provável de variação do hospedeiro, constituindo um fator importante na etiopatogênese da doença periodontal (Kiname<sup>58</sup>, 1999).

## **2.2- Ciclosporina-A (CsA)**

A CsA é um polipeptídeo cíclico que foi inicialmente isolado a partir dos fungos *Tolypocladium inflatum gams* (Goodman et al.<sup>43</sup>, 2001) e o seu maior uso é na prevenção da rejeição de transplante de órgão. A CsA também tem mostrado reduzir a morbidade e a mortalidade de doenças de enxerto versus hospedeiro em transplantes de medula óssea. Além disso, esta droga tem sido usada com sucesso no tratamento de uma variedade de doenças nas quais o sistema imune pode estar envolvido, tais como diabetes mellitus insulino-dependentes, psoríase e líquen plano erosivo, assim como, artrite reumatóide, penfigóide e pênfigo bolhoso, esclerose múltipla, colite ulcerativa e Síndrome da imunodeficiência adquirida (Boltchi et al<sup>10</sup>, 2001).

O exato mecanismo da ação da CsA não é conhecido, mas existe uma efetividade para inibição específica e reversível dos linfócitos imunocompetentes. Os linfócitos T são os preferencialmente inibidos, com as células T-helper como principal alvo, embora as células T-supressoras também possam ser suprimidas (Hallmon & Rossmann<sup>46</sup>, 2000).

A CsA interfere com os estágios precoces de ativação das células-T, inibindo a produção de IL-2, prevenindo, deste modo, a liberação de sinais

essenciais para a maturação de células-T e células-B. Embora a CsA suprima a imunidade humoral com pouca extensão, evidências sugerem que a diferenciação e proliferação das células também são afetadas (Boltchi et al<sup>10</sup>, 2001).

Segundo Borel<sup>12</sup>, 1988, a CsA age tanto na resposta humoral como na celular, mas sua ação é preferencialmente sobre a imunidade celular. A ação da CsA sobre a linhagem de linfócitos B, assim como outras interleucinas ou outros mediadores, ainda está sendo melhor estudada (Marshall & Bartold<sup>66</sup>, 1998). Segundo Nickoloff et al.<sup>74</sup>, 1988, a CsA inibe o crescimento de queratinócitos e de fibroblastos dérmicos “in vitro”. Verificou-se também “in vitro” a ação antiproliferativa da CsA sobre osteoblastos de ratos (McCauley et al.<sup>68</sup>, 1992), assim como inibição da reabsorção óssea por osteoclasto (Chowdhury et al.<sup>17</sup>, 1991). Também não é conhecida a ação sobre polimorfonucleares, mas parece prejudicar a ação e a mobilização dessas células “in vivo” (Marshall & Bartold<sup>66</sup>, 1998; Hemmerle & Frank<sup>47</sup>, 1991).

A CsA pode ser administrada na forma oral, intramuscular ou intravenosa numa formulação conhecida como Sandimmunm (Sandoz). Para manter a imunossupressão, uma dose terapêutica oral de 10 a 20 mg por Kg de peso corporal por dia é necessário. Esta dose resulta numa concentração sérica de 100 a 400 ng/mL (Boltchi et al<sup>10</sup>, 2001). Nesta concentração, a CsA inibe a síntese de IL-2 e também a capacidade de resposta dos linfócitos-T citotóxicos à IL-2. A CsA produz ainda imunossupressão através da inibição da ativação de macrófagos e prevenindo a produção de receptores de interleucina-1 (IL-1) na superfície das células T-helper. Sendo assim, a CsA parece ser seletiva na ação nos linfócitos-T (Hallmon & Rossmann<sup>46</sup>, 2000).

### **2.3- Efeitos Colaterais**

Os efeitos colaterais da CsA incluem crescimento gengival e múltiplos efeitos sistêmicos. A maioria desses efeitos são dose-dependentes e são freqüentemente reversíveis sem seqüelas após diminuição ou descontinuidade da droga (Hallmon & Rossmann<sup>46</sup>, 2000).

Além do crescimento gengival, como mais notável efeito da terapia com CsA, outros principais efeitos adversos incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hipertensão, neurotoxicidade e uma predisposição a infecções bacterianas, fúngicas e virais; além de fibrose dos tecidos pulmonar, pericardial e renal (Boltchi et al<sup>10</sup>, 2001). Adicionalmente, Goodman et al.<sup>43</sup>, 2001 tem demonstrado que a CsA causa um estado de alto turnover osteopênico em ratos; e outros autores acreditam que a CsA causa uma perda óssea em humanos.

Apesar das consideráveis atenções que os efeitos da CsA no metabolismo ósseo têm recebido, o mecanismo pelo qual esta droga induz perda óssea não é claramente entendido (Fiore et al.<sup>32</sup>, 2000).

### **2.4- Efeitos da CsA nos Tecidos Periodontais de Suporte**

O cemento, o ligamento periodontal e o osso alveolar constituem uma unidade estrutural e funcional entre o dente e o alvéolo. Dentre eles, o cemento radicular e o osso alveolar estão envolvidos pelo tratamento com CsA.

### 2.4.1- Cimento Radicular

O cimento é um tecido conjuntivo mineralizado que recobre a dentina radicular, tendo como principal função a inserção das fibras do ligamento periodontal na raiz do dente. Embora muitas vezes seja considerado como parte do dente, o cimento não é uma estrutura dentária. Desenvolve-se a partir do folículo dentário, uma estrutura que não faz parte do germe dentário propriamente dito (constituído pelo órgão do esmalte e a papila dentária). Porém, por ser depositado sobre a raiz, uma vez mineralizado, adere firmemente (Ten Cate<sup>97</sup>, 1994).

O cimento é muito semelhante ao tecido ósseo: possui aproximadamente 60% de mineral; sua matriz orgânica é constituída principalmente por colágeno do tipo I; suas células, cementoblastos e cementócitos, são similares aos osteoblastos e osteócitos respectivamente. Em contraste, o cimento é um tecido avascular que depende do ligamento periodontal para se nutrir por difusão. Ele não sofre, normalmente, remodelação, embora seja passível de reabsorção e neoformação, com uma intensidade muito menor que a do tecido ósseo (Ten Cate<sup>97</sup>, 1994).

Estudos recentes em ratos mostram que a CsA pode levar à neoformação cementária. Relatou-se que a administração oral de 10 mg/Kg de peso corporal/dia induziu abundante neoformação cementária. O cimento novo parece se depositar no cimento acelular principalmente no terço cervical das raízes, com camadas irregulares, às vezes se depositando somente em um determinado local, formando saliências de vários tamanhos e configurações,

estando os feixes de fibras do ligamento periodontal inseridos normalmente (Ayanoglou et al.<sup>1</sup>, 1996).

Ayanoglou & Lesty<sup>3</sup>, 1997, realizaram um estudo onde ratos Sprague-Dawley foram tratados com 30 mg/Kg/dia de CsA, e mostraram quantidade de cemento neoformado cobrindo extensas áreas de cemento acelular em toda superfície radicular. A neoformação era abundante no terço cervical das raízes, ocorrendo muitas vezes aumentos cementários localizados, caracterizando-se por apresentar linhas irregulares, corpos globulares e, infreqüentes linhas incrementais. Ayanoglou<sup>4</sup>, 1998, em outro estudo de nova formação de cemento, demonstrou através de exame histológico, a presença de muitas ilhotas de cemento ectópicos no interior do tecido conjuntivo gengival nas proximidades das superfícies das raízes. As estruturas destas ilhotas como novo cemento eram compactas e homogêneas ou heterogêneas, mas idênticas àquelas dos depósitos adjacentes de novo cemento. As observações deste estudo também sugerem que o abundante depósito de novo cemento formado durante o tratamento com CsA são devido a um aumento no número de células progenitoras estimuladas pela CsA e diferenciadas nos cementoblastos.

#### **2.4.2- Osso alveolar**

O tecido ósseo é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes que formam o esqueleto. É originado predominantemente do mesênquima embrionário, apresentando vários tipos celulares e matriz óssea que o fazem altamente resistente. Apresenta dois tipos macroscópicos distintos: tecido ósseo

compacto, na região mais periférica dos ossos, a cortical; e o tecido esponjoso ou trabecular, com redes de trabéculas e espaços intercomunicantes, de localização mais central, ou seja, na cavidade medular, abrigando a medula óssea (Ten Cate<sup>97</sup>, 1994).

O tecido ósseo tem 2 componentes básicos: células e matriz orgânica e inorgânica. As células osteoprogenitoras têm capacidade de diferenciação, produzindo tecidos, ósseo, cartilaginoso, fibroso e tipos intermediários osteocondróide, fibrocondróide e osteofibrocondróide (Ten Cate<sup>97</sup>, 1994).

Os osteoblastos sintetizam elementos da matriz óssea e possuem alto teor de fosfatase alcalina. Arranjam-se em fileiras na periferia da superfície óssea e, quando aprisionados em lacunas na matriz mineralizada, tomam-se osteócitos com canaliculos de comunicação com células adjacentes e a superfície óssea, para transporte de nutrientes e metabólitos (Ten Cate<sup>97</sup>, 1994).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas que se formam provavelmente pela fusão sinsicial de monócitos circulantes especializados. São ricos em fosfatase ácida e colagenase e participam da remodelação óssea e da homeostase do cálcio, uma vez que apresentam receptores para paratormônio (PTH) e calcitonina (Ten Cate<sup>97</sup>, 1994).

Segundo Brasileiro Filho et al. <sup>14</sup>, 2000, a eficácia do esqueleto em proporcionar sustentação adequada, depende da massa óssea (quantidade) e do seu estado de mineralização (qualidade). A quantidade de tecido ósseo está na dependência da formação e da destruição durante o ciclo de remodelação óssea.

O processo de mineralização e o ritmo de remodelação são influenciados por muitos fatores mecânicos e humorais, locais e gerais.

O processo de formação óssea consiste da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, proliferação de osteoblastos, deposição de matriz e mineralização.

A osteopatia metabólica é definida como um distúrbio generalizado do esqueleto, independente de sua causa. Osteoporose é uma das principais osteopatias metabólicas, e não é propriamente uma doença, mas o denominador comum de muitas afecções que provocam redução da massa óssea (Blake et al.<sup>9</sup>, 2002). Trata-se de um distúrbio quantitativo, pois o osso remanescente é bem mineralizado (Concensus Development Conference<sup>18</sup>, 1993).

Após o advento de técnicas radiológicas não invasivas para avaliar a densidade óssea, a osteoporose pode ser definida como a redução da massa de osso mineralizado a um nível suficiente para torná-lo frágil e vulnerável a fraturas. Do ponto de vista clínico, a osteoporose é classificada em dois grupos principais: *primária*, na qual a osteopenia é a doença básica, e *secundária*, atribuída à várias condições clínicas ou medicamentosa. Entretanto, um comum e sério efeito dos transplantes de órgãos halogênicos é a osteoporose, e a CsA pode contribuir para a sua patogênese (Epstein et al.<sup>30</sup>, 1996).

Porém, em relação ao osso alveolar, não está bem estabelecido se a imunossupressão induzida pela CsA pode modificar a evolução ou a dinâmica da doença periodontal inflamatória e conseqüente perda óssea (Duarte et al.<sup>27</sup>, 1998). O mecanismo de atuação da CsA sobre o osso alveolar na literatura pertinente pode ser dividido em 2 partes, com trabalhos “in vitro”

demonstrando um aumento de osteoblastia e diminuição de osteoclasia (Stewart et al.<sup>93</sup>, 1986 ; Klaushofer et al.<sup>59</sup>, 1987), com exceção do estudo de Fornoni et al.<sup>36</sup>, 2001 onde ocorreu redução do número de células capazes de sintetizar nova matriz osteóide, o que poderia contribuir para o processo de perda óssea; e uma segunda parte apresentando resultados controversos “in vivo”, com aumento da osteoclasia e uma diminuição da formação óssea (Fu et al.<sup>38</sup>, 1999) ou um aumento da osteoblastia e uma diminuição da atividade osteoclástica (Wilmink et al.<sup>103</sup>, 1989 ; Li et al.<sup>61</sup>, 1991).

Alguns estudos indicam que pacientes imunossuprimidos pela CsA desenvolvem rapidamente doença periodontal (Oshrain et al.<sup>78</sup>, 1983; Barr et al.<sup>6</sup>, 1992; Oettinger-Barak et al.<sup>75</sup>, 2001; Oettinger-Barak et al.<sup>76</sup>, 2002). Outros porém contradizem essas observações (Been & Engel<sup>7</sup>, 1982; Swango<sup>96</sup>, 1991). Em animais essa relação é incerta (Cox et al.<sup>21</sup>, 1987; Guggenheim<sup>45</sup>, 1981). A utilização e o desenvolvimento de modelos de estudos em cães e ratos, através de um irritante marginal capaz de produzir acúmulo de biofilme bacteriano, tem-se mostrado eficaz para avaliação da evolução da microbiota, assim como da resposta dos tecidos periodontais ao biofilme estabelecido (Johnson<sup>51</sup>, 1975; Sallum<sup>83</sup>, 1982; Fischer & Klinge<sup>33</sup>, 1994).

Fischer & Klinge<sup>33</sup> (1994) avaliaram a influência de diversas doses de CsA sobre a evolução da doença periodontal experimental em furões domésticos, e os resultados histométricos demonstraram uma significativa perda de inserção e reabsorção óssea, completando com reabsorção radicular nos dentes experimentais. Histopatologicamente verificou-se que o número de polimorfonucleares neutrófilos e linfócitos era significativamente maior nos dentes

com doença periodontal induzida em relação aos dentes controles. Os resultados indicaram que as células-T do sistema imune podem participar do mecanismo de defesa contra a patologia periodontal em furões domésticos.

Fischer et al<sup>34</sup> (1996), usando métodos semelhantes ao experimento anteriormente descrito, obtiveram resultados que foram comparados com suas prévias investigações, onde os furões não foram tratados com CsA, mas somente submetidos a ligaduras induzindo periodontites experimentais. Quanto a microbiota, as espécies de *Eubacterium ssp.* eram ausentes em animais não tratados com CsA, enquanto que estas espécies eram freqüentemente presentes nos furões imunossuprimidos. Os resultados indicaram que a presença de um grande número de gram negativos e bactérias anaeróbicas podem ter um aumento no processo inflamatório.

Hemmerle & Frank<sup>47</sup> (1991) avaliaram a invasão bacteriana dos tecidos periodontais após imunossupressão experimental em ratos. Foi induzida uma gengivite moderada através da dieta 2000 (Keyes & Jordan<sup>57</sup>, 1964) em três grupos de 10 ratos adultos Wistar, , por 30 dias. O primeiro grupo serviu como controle não tratado. O segundo grupo recebeu cinco injeções intraperitoneais de CsA (15mg/Kg) do 20° ao 30° dia para interferir com a ativação dos linfócitos-T e a síntese de interleucinas. O terceiro grupo recebeu duas injeções intraperitoneais de ciclofosfamida (100mg/Kg) do 20° ao 25° dia, com o objetivo de induzir severa neutropenia. Os autores encontraram invasão bacteriana somente no grupo da ciclofosfamida, e um intenso infiltrado de polimorfonucleares em todos os grupos. Dados adicionais sobre a reabsorção da crista óssea alveolar foram obtidos de

acordo com o método de Keyes & Gold<sup>56</sup> (1955), comparando as distâncias médias entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar na região dos molares inferiores. Os resultados mostraram maior reabsorção óssea nos grupos da CsA e ciclofosfamida, quando comparados ao controle. Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significantes quanto à perda óssea entre os dois grupos medicados.

Fu et al.<sup>38</sup>, (1999), realizaram um estudo para avaliar histologicamente e histomorfometricamente, através de um microscópio de luz, os efeitos da CsA (30 mg/Kg/dia, via gástrica) no osso alveolar de ratos. Observou-se com os resultados demonstrados, um “parentesco” distinto de aumento de osteoclasia e redução de formação óssea observados nos animais expostos à CsA em relação ao grupo controle. O aumento de osteoclasia era observado nos sítios periodontais e o decréscimo de formação óssea era observado nos sítios sinfisais. Assim, os resultados sugeriram, segundo os autores, que a CsA tem efeitos distintos no metabolismo do osso alveolar.

Fu et al.<sup>40</sup>, (2001), avaliou morfologicamente e histometricamente os efeitos da CsA sobre o osso, desta vez sobre o rebordo edêntulo recém formado em ratos. Após a extração de todos os molares superiores direitos de 16 ratos Sprague-Dawley, foi aguardado um período de cicatrização de 2 semanas. Os ratos foram divididos em grupo teste e grupo controle. O grupo teste recebeu 15 mg/Kg de CsA, via gástrica por 4 semanas, enquanto que o grupo controle recebeu apenas óleo mineral. Os animais foram sacrificados no final do experimento e foram obtidos modelos de estudo do rebordo desdentado para avaliação morfológica, incluindo medidas da espessura vestibulo-lingual e da

altura vertical do rebordo. Para a análise histométrica, foram selecionados 10 cortes descalcificados do rebordo de cada animal, nos quais foram feitas as medidas das áreas de tecido mole e de osso trabecular. A avaliação morfológica mostrou que a terapia com CsA produziu um aumento significativo tanto na espessura quanto na altura do rebordo. A análise histológica mostrou um aumento na área total de tecido mole e uma significativa perda de volume ósseo trabecular no grupo teste, quando comparado ao grupo controle. Os autores concluíram, com isso, que a CsA pode induzir, além do crescimento gengival, alterações ósseas no rebordo edêntulo.

Shen et al.<sup>88</sup> (2001) realizaram um estudo para avaliar a histomorfologia óssea dos alvéolos dentais ao redor do segundo molar superior de ratos Sprague-Dawley tratados com CsA. Um grupo recebeu CsA 15 mg/Kg diariamente e o grupo controle recebeu apenas óleo mineral. No final de 2 e 4 semanas os ratos foram sacrificados. Esses alvéolos dentais foram frontalmente seccionados e corados com azul de toluidina. Avaliação histométrica incluindo volume ósseo, superfície óssea específica e formação de osteóide foram medidas nas porções vestibular, apical e palatina nos alvéolos. Os resultados mostraram massa óssea total dos alvéolos diminuída no grupo da CsA em relação ao controle. Todas as medidas histométricas, exceto superfície óssea específica, foi significativamente afetada pela terapia com CsA. Sendo assim, os autores concluíram que a CsA tem um efeito inibitório na formação óssea nos alvéolos dentais da região maxilo-facial.

Contraditoriamente aos resultados descritos anteriormente, Nassar et al.<sup>73</sup>, 2000, avaliaram o efeito da CsA sobre a perda óssea alveolar em ratos,

*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman, imunossuprimidos com 10 mg/Kg de peso corporal/dia, na doença periodontal induzida por ligadura. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 7 grupos, sendo eles: grupo I (controle): sem ligadura e sem tratamento com CsA durante 30 dias; grupo II: somente presença de ligadura por 30 dias; grupo III: presença de ligadura por 15 dias + 15 dias de tratamento com CsA com ligadura; grupo IV: 15 dias de tratamento com CsA + 30 dias de CsA com ligadura; e grupos V, VI e VII: somente tratamento com CsA, por 15, 30 e 45 dias respectivamente. Os aspectos radiográficos de todas as hemimandíbulas mostraram que os grupos experimentais tiveram perdas ósseas alveolares maiores em relação ao grupo I (controle). Os ratos do grupo II apresentaram maiores perdas ósseas alveolares envolvendo a área de furca e notou-se que a crista óssea alveolar nas hemimandíbulas desses ratos (grupo II) apresentava-se reabsorvida, próximo ao osso basal da mandíbula. Nos demais grupos, a perda óssea não foi acentuada, não houve envolvimento de furca que pudesse ter sido notado radiograficamente, apenas houve maior variação na altura das cristas ósseas alveolares, por conseqüente perda óssea maior nos grupos III e IV em relação aos grupos V, VI e VII. Sendo assim, os autores concluíram que a imunossupressão induzida por CsA diminui, em média, a intensidade de perda óssea alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura.

Estudos realizados em humanos (Wilmink et al. <sup>103</sup>, 1989) e em cães “in vivo” (Li et al. <sup>61</sup>, 1991), estão de acordo com os achados do estudo anteriormente descrito, exibindo um aumento de parâmetros osteoblásticos e decréscimos de parâmetros osteoclásticos.

Ainda de acordo com estes achados, Cox & Williams-Miller<sup>20</sup>, (1986), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a destruição periodontal induzida por ligaduras em ratos congenitamente atímicos (ratos deficientes quanto à função das células T) e em ratos normais heterozigotos. Foram utilizados 16 ratos, sendo 8 atímicos e 8 normais, que receberam ligaduras ao redor do segundo molar superior, unilateralmente. Metade de cada grupo recebeu 10 mg/Kg de CsA, via gástrica. Após sete dias os ratos foram sacrificados e foram realizadas as medidas de perda óssea. Tanto os ratos homozigotos quanto os heterozigotos demonstraram uma perda óssea significativa com sete dias de ligadura. Entretanto, os ratos medicados com CsA exibiram inibição da perda óssea quando comparados com os animais não medicados. Sendo assim, os autores concluíram que é possível que a perda óssea induzida por ligaduras seja mediada por outros mecanismos além da IL-2 e da atividade das células T, ou que estas células sejam resistentes a pequenas doses de CsA.

Estudos “in vitro” têm demonstrado que a CsA inibe a reabsorção óssea (Stewart et al.<sup>93</sup>, 1986; Klaushofer et al.<sup>59</sup>, 1987; Stewart & Stern<sup>94</sup>, 1989; McCauley et al.<sup>68</sup>, 1992). Para estudar este efeito inibitório não específico da CsA na reabsorção óssea “in vitro”, Chowdhury et al.<sup>17</sup>, 1991, realizaram um estudo do efeito da CsA na reabsorção óssea basal e estimulada pelo hormônio paratireóide bovino em cultura de osteoclastos novos. Os resultados mostraram que numa concentração de 10 µg/ml de CsA ocorreu uma inibição quase total de reabsorção óssea associada a uma redução no número de células multinucleadas. Já numa concentração de 1 µg/ml de CsA ocorreu uma redução significativa na reabsorção

óssea basal, entretanto, não foi associada com alguma diminuição no número de células multinucleadas.

Ainda para observar o mecanismo deste efeito observado, Stewart & Stern<sup>94</sup>, 1989, compararam a CsA com medicamentos análogos, de diferentes potenciais imunossupressores. A CsA, assim como a CsG, também com alto potencial imunossupressor, inibiram a reabsorção óssea estimulada pelo hormônio paratireoideano (PTH) e pela IL-1. Os análogos sem potencial imunossupressor (CsH e CsF) não inibiram a reabsorção óssea estimulada pelo PTH e IL-1. Um análogo de baixo potencial imunossupressor (CsD), por sua vez, não inibiu significativamente a reabsorção óssea induzida pelo PTH. Os autores concluíram que, embora outros mecanismos não possam ser excluídos, os dados são consistentes com o conceito de que a reabsorção óssea envolve um mediador do sistema imunológico.

A literatura científica relata poucos estudos do efeito da CsA no osso alveolar, tanto em humanos quanto em estudos experimentais, “in vivo” e “in vitro”. Tentando elucidar melhor os efeitos da CsA no tecido ósseo, estudos realizados em ossos longos fazem parte desta revisão.

Os efeitos da CsA no osso são dose e tempo-dependente. A idade dos ratos e o tipo de osso modificam a resposta de remodelação óssea quando da atuação da CsA (Ayanoglou et al.<sup>2</sup>, 1997). Alguns estudos mostram que altas doses aumentam a reabsorção óssea e conseqüente destruição destes tecidos (Ayanoglou et al.<sup>3</sup>, 1997; Fu et al.<sup>38</sup>, 1999), enquanto outros estudos mostram que em doses menores a CsA pode prevenir a osteopenia após transplante de fígado (Westeel et al.<sup>102</sup>, 2000).

Vários estudos têm demonstrado que a CsA acelera a reabsorção e formação óssea, induzindo um estado de alto-turnover osteopênico “in vivo” (Zeni et al. <sup>107</sup>, 2002; Goodman et al. <sup>43</sup>, 2001; Cueto-Manzano et al. <sup>22</sup>, 1999; Ekelud & Nilsson<sup>29</sup>, 1996), onde a reabsorção excede a formação, e está provavelmente associado com um significativo aumento no número de osteoclastos (Stein et al. <sup>92</sup>, 1992). Porém, este estado de alto-turnover osteopênico produzido pela CsA, como já citado anteriormente e segundo Sass et al. <sup>84</sup>, 1996, é dose e duração-dependente. Del Pozo, et al. <sup>26</sup>, 1995, em um estudo comparando os diferentes efeitos da CsA na remodelação óssea em ratos jovens e adultos, através da administração oral de três concentrações diferentes de CsA (5, 15 e 30 mg/Kg) durante 30 dias, observaram que a dose de 15 mg/Kg produziu uma redução significativa no volume trabecular da tíbia dos ratos jovens, onde o crescimento esquelético não está completo, e a dose de 30 mg/Kg, além do volume trabecular da tíbia, produziu também uma redução significativa em todo o esqueleto mineral. Na verdade, segundo este autor, uma dose de 7 mg/Kg tem aumentado a nova formação óssea e reduzido a atividade osteoclástica em ratos. Em outro estudo, combinando tratamento com CsA e Flurbiprofen, um antiinflamatório não-esteróide derivado do ácido propiônico, o qual “in vivo” tem sido demonstrado reduzir o número de osteoclastos em ratos, foi proposto para prevenir a perda óssea associada com a terapia com CsA. O estudo realizado em ratos Sprague-Dawley durante 28 dias e com administração de 15 mg/Kg de CsA sozinha ou associada ao Flurbiprofen, mostrou evidência de osteopenia trabecular com uma perda de 60% do volume trabecular ósseo em ambos os grupos e um aumento no turnover

ósseo no grupo tratado apenas com CsA (Sass et al. <sup>84</sup>, 1996), estando de acordo com prévios estudos.

Zeni et al. <sup>107</sup>, 2002, em um estudo em ratos Sprague-Dawley, avaliou mudanças no turnover ósseo e densidade óssea mineral induzidos pelo tratamento com CsA a 15 mg/Kg por um período de 30 dias, e os resultados mostraram que, sob condições experimentais, houve um aumento na reabsorção óssea sem mudanças na formação óssea, o que pode levar a um efeito deletério no esqueleto e isso se reflete nas medidas de densidade óssea mineral. Além disso, uma análise bioquímica para avaliar a concentração de dioxipiridinolina na urina (um marcador de reabsorção óssea) mostrou um aumento na excreção desta substância nos dias 14 e 30 do experimento, o que de acordo com outros autores isso se reflete em um aumento na reabsorção óssea. Em consequência desta reabsorção, resultados histomorfométricos deste e de vários estudos mostraram uma perda óssea trabecular da tíbia pela administração de CsA 15 mg/Kg em ratos. Embora tenha ocorrido perda óssea na região da tíbia e espinha (áreas trabeculares), o esqueleto em geral e a tíbia média (áreas corticais) não mostraram mudanças na densidade óssea mineral. Estes resultados poderiam refletir que apesar de a CsA ter efeitos osteopênicos, apenas as áreas trabeculares são mais sensíveis e mostraram uma diminuição em seu volume ósseo. Esta diferença pode ser parcialmente explicada pelo fato de que o osso trabecular é metabolicamente mais ativo que o osso cortical e também mais susceptível a fatores locais como as citocinas que são afetadas pela administração de CsA.

Cvetkovic et al.<sup>23</sup>, 1994, avaliou “in vivo” os efeitos a longo prazo da administração de três tipos de drogas imunossupressoras (CsA, CsG e FK506) no metabolismo ósseo mineral em ratos, utilizando 5 grupos de 15 ratos Sprague-Dawley que receberam por um período de 28 dias: (1) Cs-veículo; (2) CsA 15 mg/Kg de peso corporal; (3) CsG 15 mg/Kg de peso corporal; (4) FK506-veículo; (5) FK506 5 mg/Kg de peso corporal. Os resultados da histomorfometria óssea da tíbia, comparados com os respectivos veículos, mostraram que os três imunossupressores causaram significativa redução de área trabecular: 34% para CsG, 44% para CsA e 64% para FK506. Esta mudança foi devido a uma acentuada redução no número trabecular, bem como, um notável aumento na separação trabecular. Estes parâmetros refletem um notável e profundo grau de perda óssea em animais tratados com imunossupressores. Todos os grupos tratados com drogas demonstraram um aumento na relação de formação óssea relativa ao volume tecidual. Sendo assim, o índice histomorfométrico mostrou que os três imunossupressores causam acelerada remodelação, com a reabsorção excedendo a formação, levando a uma perda de volume ósseo trabecular; e confirmando resultados de outros estudos, onde a CsA induz um alto turnover de osteopenia em ratos “in vivo”.

Kawana et al.<sup>55</sup>, 1996, realizaram um estudo para avaliar o efeito da CsA no metabolismo ósseo de ratos, por meio de marcadores químicos e histomorfometria das tíbias. Um total de 12 ratas Sprague-Dawley foram divididas em dois grupos, sendo que 6 ratas receberam CsA 15 mg/Kg durante 28 dias e 6 ratas receberam óleo oliva veículo que serviram como controle. Após 28 dias as ratas foram sacrificadas e os resultados histomorfométricos mostraram que o

grupo que recebeu CsA apresentou um volume ósseo trabecular significativamente menor que o grupo controle. Os resultados histoquímicos mostraram que as taxas de piridinolina urinária (um marcador de reabsorção óssea) aumentaram significativamente no grupo que recebeu CsA, entretanto, a formação óssea estimada através das taxas de osteocalcina sérica e o volume osteóide não tiveram diferenças significantes entre os dois grupos. Estes resultados, segundo os autores, sugerem que a CsA administrada por 28 dias induz osteopenia em ratas, devido ao desequilíbrio no turnover ósseo caracterizado por excesso na reabsorção e respectiva formação óssea.

Finalmente, para avaliar se a CsA tem um efeito direto na proliferação de osteoblastos, a viabilidade e/ou habilidade em sintetizar ou degradar matriz extracelular, Fornoni et al.<sup>36</sup>, 2001, propôs um estudo "in vitro" expondo osteoblastos MC3T3-E1 a doses aumentadas de CsA (0, 0,5, 1 e 5 µg/ml) e os resultados mostraram que à exposição de CsA por 48 horas ocorre diminuição no número de osteoblastos em uma dose-dependente com ausência de apoptose ou citotoxicidade. Já a CsA a uma dose de 5 µg/ml por 72 horas causou diminuição da expressão do RNAm de colágeno tipo I e atividade aumentada de matriz metaloproteinase-9. A atividade do tecido inibidor de matriz metaloproteinase-1 não foi afetada e em dose-dependente, houve aumento de tecido inibidor de matriz metaloproteinase-2. Esses dados, segundo o autor, sugerem que a CsA altera a síntese e degradação da matriz extracelular em osteoblastos MC3T3-E1 pela diminuição da produção de colágeno tipo I e aumento na atividade de matriz metaloproteinase-9. Ainda segundo o autor, a combinação de aumento da

atividade de matriz metaloproteinase-9 com a não mudança da atividade do tecido inibidor de matriz metaloproteinase-1 poderia reduzir a matriz osteóide com capacidade para mineralização. Além disso, a diminuição da proliferação poderia adicionalmente, reduzir o número de células que sintetizam nova matriz osteóide e contribuir, deste modo, para o processo de perda óssea. Este é o primeiro estudo para investigar o efeito da CsA na síntese e degradação da matriz óssea extracelular (Fornoni et al. <sup>36</sup>, 2001) e talvez seja o único estudo realizado “in vitro” encontrado na literatura que contrarie os resultados dos outros estudos “in vitro” (que têm demonstrado que a CsA inibe a reabsorção óssea) e estas mudanças nele encontradas possam talvez contribuir para a osteopenia observada em pacientes tratados com CsA (Fornoni et al. <sup>36</sup>, 2001).

### 3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da CsA sobre o tecido ósseo de ratos com ou sem doença periodontal induzida por ligadura. Para isso, utilizou-se:

- Avaliação histológica, histométrica e estereométrica do processo alveolar.
- Determinação da concentração sérica de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e fosfatase alcalina no sangue de todos os grupos de animais.
- Determinação da espessura de cemento de ambas as raízes dos primeiros molares inferiores.

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1- Animais utilizados

No presente trabalho, foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman) machos, adultos, com peso inicial de aproximadamente 100 gramas, alimentados com ração e água “ad Libitum” provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Araraquara. Após a avaliação clínica e a verificação da normalidade gengival, os ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 6 animais cada como mostra a tabela 1, e mantidos em gaiolas plásticas, de acordo com os grupos experimentais.

*Tabela 1-* Distribuição dos grupos de ratos, de acordo com o tratamento proposto (o período experimental foi de 30 dias).

GRUPOS	Nº DE RATOS POR GRUPO (n)	TRATAMENTO
1	06	Injeções subcutâneas de solução salina
2	06	Doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura
3	06	Doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura e tratamento com CsA
4	06	CsA

## 4.2- Anestesia

Os animais receberam anestesia geral obtida com injeção intraperitoneal de 0,08 mL/100g de peso corporal de Ketamina\* e 0,04mL/100g de peso corporal de cloridrato de xilasina\*\*.

## 4.3- Indução da doença periodontal

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada (figura 1) a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula (figura 2). Posteriormente ao posicionamento dos animais, foram realizados afastamentos temporários entre o primeiro e o segundo molar inferior, com o auxílio de uma sonda exploradora nº 5 (figura 2). Após o afastamento, procedeu-se a colocação da ligadura por meio de um fio de algodão de cor preto, nº 24, marca Corrente ao redor do primeiro molar inferior (figura 3). Os fios eram colocados ao nível do sulco gengival dos primeiros molares de ambos os lados , e posicionados por meio de nós cirúrgicos para amarra (figura 4). Esta ligadura atuou como irritante gengival, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana, conforme técnica preconizada por Johnson<sup>51</sup> (1975) .

---

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

\*\*Virbaxyl 2%, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda



Figura 1: Rato anestesiado e posicionado na mesa operatória com a abertura da cavidade bucal correta.



Figura 2: Sonda exploradora nº 5, provocando afastamento temporário entre o primeiro e segundo molar inferior para a colocação da ligadura na região do sulco gengival.



Figura 3: Colocação da ligadura com o auxílio de uma pinça clínica adaptada, na região distal do primeiro molar inferior do rato.



Figura 4: Presença da ligadura posicionada na região de sulco para indução da doença periodontal.

#### **4.4- Ciclosporina (CsA<sup>\*\*\*</sup>)**

##### **4.4.1- 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 a concentração final de 10 mg/mL.

##### **4.4.2- Tratamento com CsA**

A CsA foi administrada na concentração de 10 mg/Kg de peso corporal/dia, por via subcutânea, conforme Wassef, et al.<sup>100</sup> (1985) e Spolidorio<sup>90</sup> (1996) , durante todo o período experimental.

Todos os animais foram sacrificados após os 30 dias do início do experimento.

#### **4.5- Avaliação Bioquímica**

Após 30 dias de tratamento, os ratos receberam anestesia geral obtida com injeção intraperitoneal de 0,08 mL/100g de peso corporal de Ketamina\* e 0,04mL/100g de peso corporal de cloridrato de xilasina\*\*. Os ratos foram submetidos à coleta de amostras de sangue (aproximadamente 5 mL)

---

<sup>\*\*\*</sup>Sandimmun Neoral (Novartis)

através de punção cardíaca direta. 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 determinou-se a concentração de Ca<sup>++</sup> e ALP (Fosfatase alcalina total).

A determinação de Ca<sup>++</sup> foi feita através do método espectrofotométrico (o Ca<sup>++</sup> 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 utilizou-se o método colorimétrico. Este método utiliza a reação de hidrólise do p-nitrofenilfosfato, pela ALP, com formação do produto colorido p-nitrofosfato, para isso foi utilizado o Kit Bayer-Sera Pak<sup>®</sup> alkaline phosphatase (SCE).

Os resultados foram expressos em UI. Para as leituras espectrofotométricas das análises de Ca<sup>++</sup> e ALP, utilizou-se o espectrofotômetro Technicon SMA-24.

#### **4.6- Análise Microscópica**

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 e fixada em formol tamponado (pH 7.2) 10% durante 48 horas. Após a fixação, as mandíbulas foram lavadas em água corrente por 24 horas. Em seguida, as mandíbulas foram imersas em solução descalcificadora constituída de

50 mL de ácido fórmico a 50% e 50 mL de citrato de sódio a 20% (Morse<sup>69</sup>, 1945) e trocadas três vezes por semana.

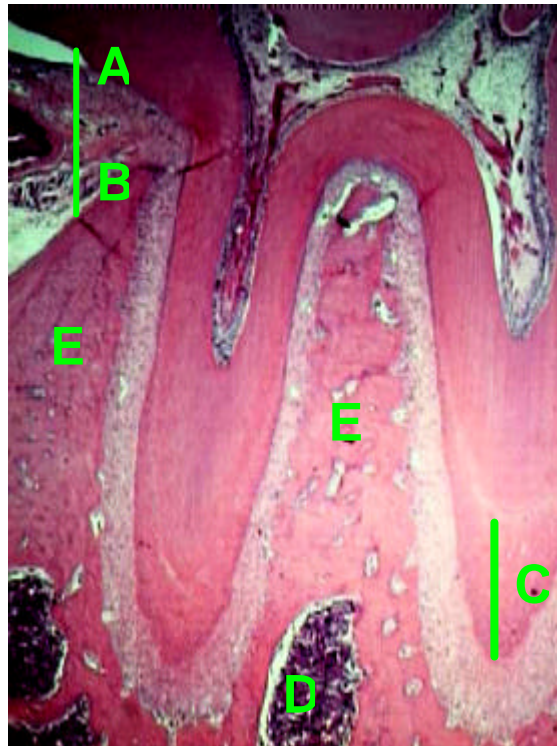
Após a descalcificação, as mandíbulas foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as mandíbulas foram incluídas em parafina, de forma padronizada para obtenção de cortes histológicos seriados e paralelos de 5 $\mu$ m de espessura no sentido vestibulo – lingual e foram corados com Hematoxilina/Eosina (H.E.)

A análise microscópica foi realizada por dois examinadores 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 direita e esquerda.

#### **4.7- Análise Histométrica**

As medidas histométricas foram feitas nas hemimandíbulas direita e esquerda em todos os grupos, utilizando-se o programa analisador de imagens Sigma Scan 2.0 (Jandel Sigma Scan – Image Measurement Software), acoplado a um microscópio de luz Diastar (Cambridge Instruments, Buffalo, NY, USA) com objetiva 2,5 a intervalos de 10 cortes entre uma contagem e outra no seriamento do corte (cerca de 50  $\mu$ m).

As mensurações foram feitas a partir dos pontos expressos na figura 5.



*Figura 5:* Corte transversal do primeiro molar inferior de rato normal mostrando os pontos e os segmentos de referência usados para as medidas histométricas. O resultado foi expresso em mm.

**AB:** Distância da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar nas faces mesial e distal dos primeiros molares inferiores.

**C:** Espessura de cimento das raízes mesial e distal dos primeiros molares inferiores.

**D:** Área de tecido mole do processo alveolar.

**E:** Área de tecido duro do processo alveolar.

Ambas as áreas, **D** e **E**, foram delimitadas em largura pelas porções externas dos tecidos gengivais e em altura pelos forames apicais.

#### 4.7- Estereometria do Processo Alveolar

Para a estereometria do processo alveolar, a densidade volumétrica de osteoclastos multinucleados ( $V_o$ ), osso alveolar ( $V_{\text{osso}}$ ), medula ( $V_{\text{medula}}$ ) e relação de superfície óssea/superfície reabsorvida ( $SO/SR - \%$ ) foi estimada. A quantificação foi feita com auxílio de um programa analisador de imagens (Mocha Jandel Scientific San Rafael, CA, USA), acoplado a um microscópio de luz Diastar (Cambridge Instruments, Buffalo, NY, USA), com objetiva de imersão (200x), a intervalos de 10 cortes entre uma contagem e outra no seriamento dos cortes (cerca de 50  $\mu\text{m}$ ). Foram contados 25 pontos coincidentes sobre as estruturas histológicas em 32 cortes do processo alveolar dos primeiros molares inferiores (cada corte correspondia a um campo), numa distância de 10 cortes entre uma contagem e outra, perfazendo-se um total de 800 pontos em todo o processo alveolar em ambas as hemimandíbulas por rato. O  $V_o$ ,  $V_{\text{osso}}$ ,  $V_{\text{medula}}$  e  $SO/Sr$  foram expressos em porcentagem do total de pontos contados, onde foram feitos para a determinação da densidade volumétrica de osteoclastos (células gigantes multinucleadas com citoplasma acidófilo e/ou espumoso), do tecido ósseo e outras estruturas, que correspondem ao espaço medular ou tecido conjuntivo fibroso, nervos e espaços vazios. A contagem de osteoclastos, tecido ósseo e espaço medular ou área de tecido mole, foram feitas separadamente, sendo que foram quantificadas em 3 diferentes localizações anatômicas: região mesial, apical/interradicular (região próximo ao ápice) e a região distal. O método usado para a quantificação da determinação da densidade de volume das estruturas em análise, foi baseado no princípio fundamental da estereologia estabelecido por

Delesse<sup>25</sup> (1848) e aplicados à histologia por Weibel<sup>101</sup> (1979), onde o volume relativo (%) foi calculado através da fórmula:  $P_{pi} = P_i/P$  onde:

$P_{pi}$  = densidade de volume das estruturas da área

$P_i$  = soma do número de pontos coincidentes sobre cada estrutura

$P$  = número total de pontos do retículo, multiplicando-se o número de pontos do retículo pelo número de campos examinados (25 pontos x 32 campos = 800).

Ex: A somatória do número de pontos que incidiram sobre osteoclastos foi 40 e o número total de pontos contados em todo o processo alveolar do lado direito foi de 800, tem-se então  $P_{pi} = 40/800 = 0,05$  ou 5%.

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Avaliação Bioquímica

A tabela 2 e as figuras 6 e 7 mostram os níveis de  $\text{Ca}^{++}$  e fosfatase alcalina dos animais tratados com CsA e submetidos ou não à periodontite experimental.

No grupo controle (grupo 1) e no grupo com periodontite experimental (grupo 2), os níveis de cálcio sérico e fosfatase alcalina foram semelhantes, com médias que variavam entre  $10,6 \pm 0,3$  mg/dL,  $843 \pm 76$  U/dL e  $10,1 \pm 0,2$  mg/dL,  $836 \pm 81$  U/dL, respectivamente.

Nos grupos tratados com CsA (grupos 3 e 4), os níveis de cálcio sérico diminuíram significativamente quando comparados com os grupos não tratados com CsA ( $p < 0,05$ ). Diminuição nos níveis de fosfatase alcalina também foi observado nos grupos tratados com CsA, entretanto estes valores não foram diferentes estatisticamente daqueles do grupo controle.

As figuras 6 e 7 ilustram a tabela 2.

Tabela 2 – Médias e desvios padrões da determinação de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e fosfatase alcalina (ALP) no soro de ratos tratados por período de 30 dias de tratamento com CsA e do respectivo grupo controle.

Grupos	Cálcio Sérico (mg/dL)	Fosfatase Alcalina Sérica (U/dL)
1 (n=6)	10,6±0,3	843±76
2 (n=6)	10,1±0,2	836±81
3 (n=6)	9,0±0,2*	780±91
4 (n=6)	9,3±0,3*	760±76

Os dados são representados como média ± desvio padrão quando n=6, onde n corresponde ao nº de ratos por grupo.

\* P< 0.05, estatisticamente significante versus ratos controles

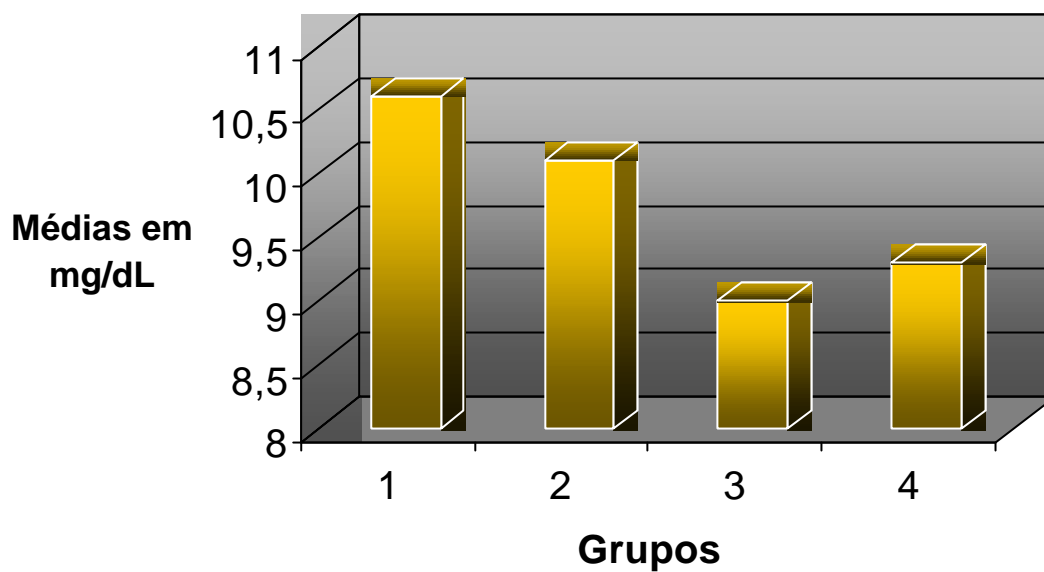


Figura 6 – Médias das concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  medidas em mg/dL nos vários grupos estudados (Ver tabela 2)

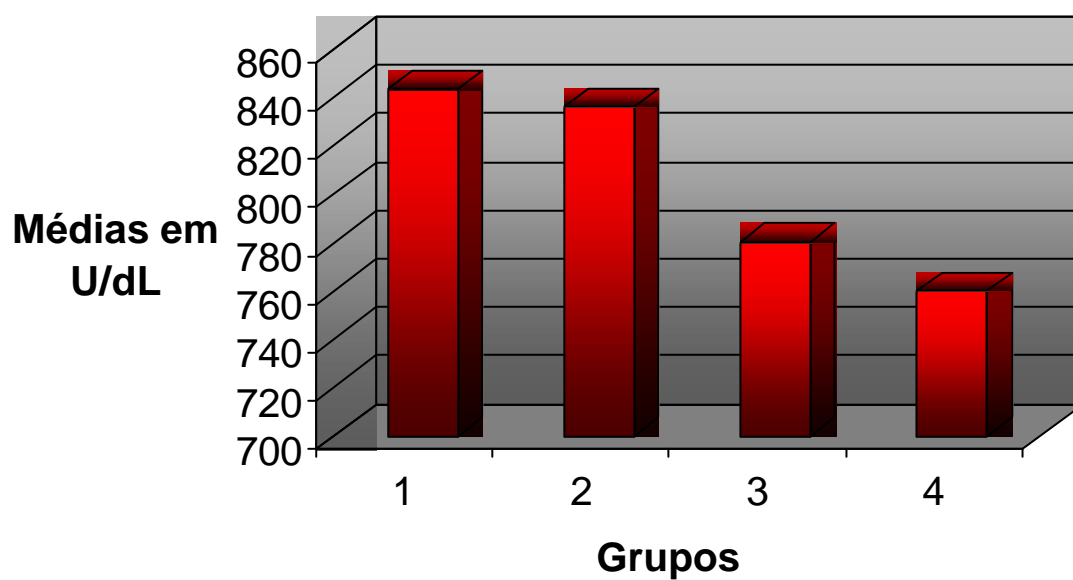


Figura 7 – Médias das concentrações de ALP medidas em U/dL nos vários grupos estudados (ver tabela 2)

## **5.2- Análise Microscópica**

### **5.2.1. Grupo 1 (controle)**

Nos ratos controle, o processo alveolar era constituído pelas tábuas ou corticais externa e interna, tanto na face mesial quanto na face distal (figura 8), o osso alveolar que forma as paredes do alvéolo dentário e o osso esponjoso entre ambos consistia de uma porção externa ou cortical de espessura variável formada por osso compacto regular, uma porção esponjosa central, e na porção próxima ao ligamento periodontal, delimitando internamente o alvéolo dentário, observava-se osso compacto irregular de espessura variável, também chamada de porção cribiforme (figura 9).

O tecido ósseo da região interradicular (figura 10) e do corpo da mandíbula apresentavam-se com trabéculas maiores, de espessuras variáveis que delimitavam pequenas áreas de tecido medular.

A gengiva da face mesial e distal da região do primeiro molar inferior era formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com exceção da porção que participava da junção dentogengival. Entre as células do epitélio juncional, havia pequeno número de neutrófilos e o corion gengival subjacente apresentava infiltrado inflamatório composto principalmente por células polimorfonucleares.

O cemento se mostrava com aspecto de normalidade recobrendo a dentina radicular. A espessura do cemento variava conforme a região, apresentando-se mais espesso e irregular no terço médio e apical da raiz do dente, e mais delgado e regular na porção cervical da raiz e região de furca. No terço médio e apical e áreas de furca do dente, o cemento era celularizado

apresentando inúmeros cementócitos em lacunas individuais. Disposto paralelamente à superfície cementária, eventualmente era possível observar camada única de cementoclasto, que se caracterizava como células de morfologia arredondada, ovalada ou muitas vezes achatadas.

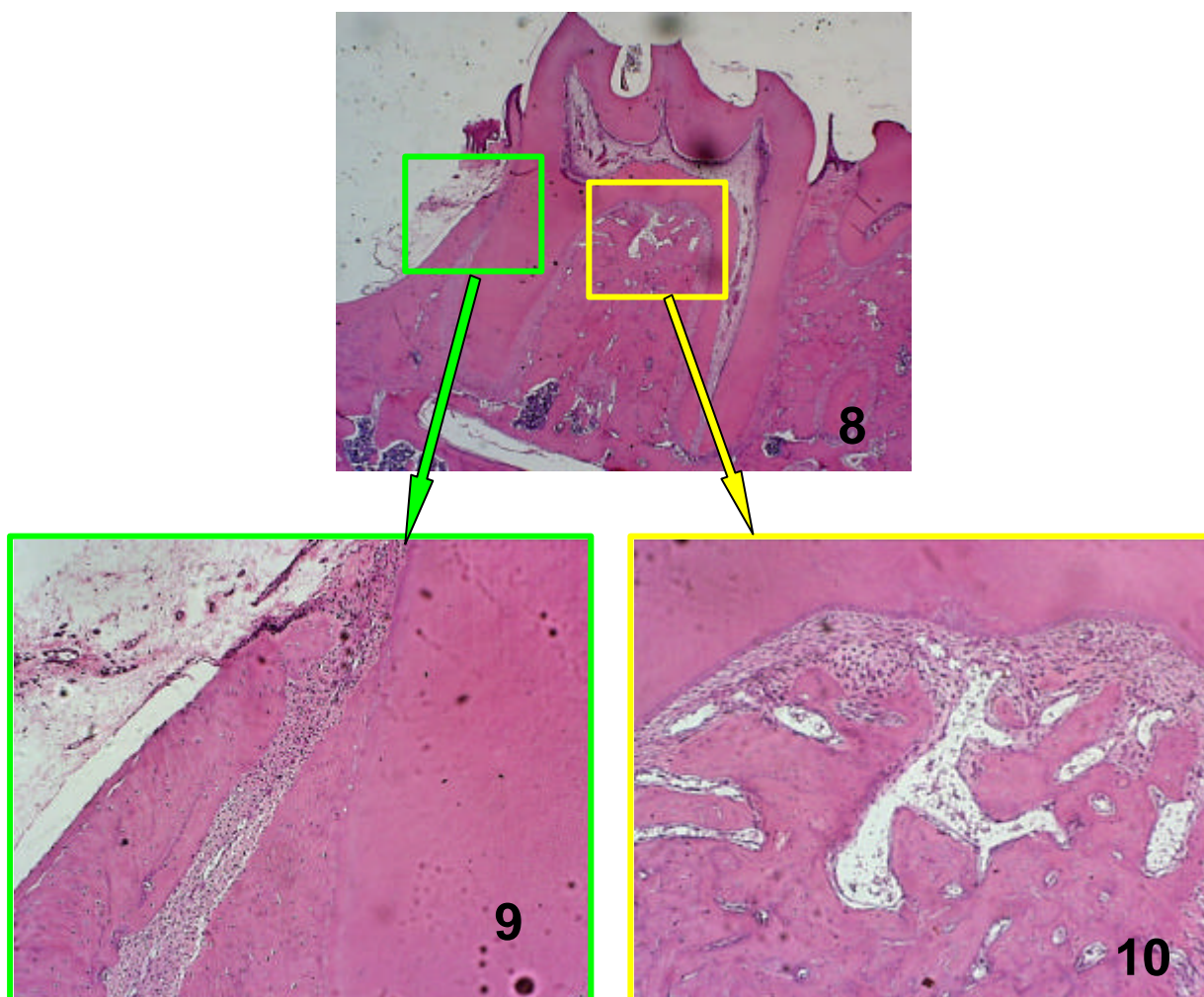


Fig 8 – Processo alveolar da região de primeiro molar inferior de rato normal, mostrando as tábuas ósseas mesial (M) e distal (D), gengival livre mesial e distal e área interradicular. Grupo 1. H.E. Aumento 2x/0,08

Fig 9 – Destaque em maior aumento da fig 8, mostrando integridade da porção mesial do processo alveolar. Grupo 1. H.E. Aumento 10x/0,40

Fig 10 – destaque em maior aumento da fig.8, mostrando trabéculas ósseas de várias espessuras, delimitando espaços ocupados por tecido mole. Grupo 1. H.E. Aumento 10x/0,40.

### **5.2.2. Grupo 2**

O tecido gengival mesial e distal apresentava-se com epitélio desorganizado (figura 11) e o tecido conjuntivo subjacente, com faixa de infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares. Em continuidade observava-se intenso processo inflamatório de células mononucleares (figura 12). O septo ósseo, assim como o osso da região interradicular (figura 13) de ambas as faces, mostravam-se com extensas áreas de reabsorção. Em alguns casos, o terço cervical dos dentes apresentava-se exposto.

O tecido ósseo do corpo da mandíbula apresentava-se com aspecto de normalidade.

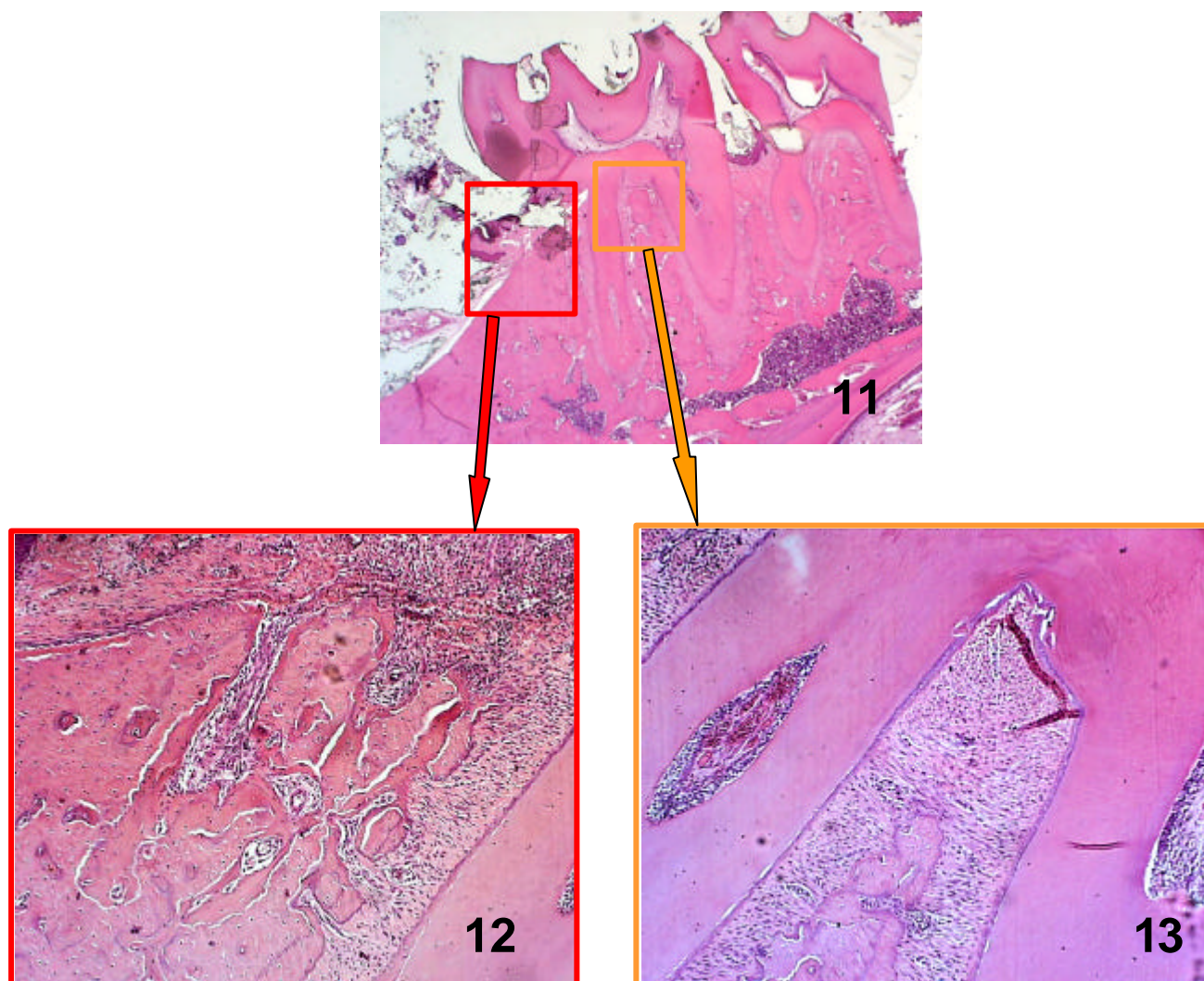


Fig 11 – Processo alveolar da região de primeiro molar inferior de rato submetido a doença periodontal mostrando as tábuas ósseas mesial (M) e distal (D), gengival livre mesial e distal e área interradicular. Grupo 2. H.E. Aumento 2x/0,08

Fig 12 – Destaque em maior aumento da fig.11 mostrando crista óssea reabsorvida. Grupo 2. H.E. Aumento 10x/0,40

Fig 13 – Destaque em maior aumento da fig.11 mostrando a região interradicular com extensa área de reabsorção. Grupo 2. H.E. Aumento 10x/0,40.

### 5.2.3. Grupo 3

Após 30 dias de tratamento com CsA e ligadura, verificou-se que todos os animais apresentavam aumento gengival tanto na região mesial quanto na região distal. O corion gengival apresentava discreto infiltrado de células mononucleares. A gengiva da face mesial e distal apresentava-se com sinais de desorganização, porém em menores proporções que o grupo somente com ligadura (figura 14).

O processo alveolar apresentava-se parcialmente íntegro, delimitando todas as estruturas adjacentes normalmente (figura 17). A região central (tecido ósseo esponjoso) apresentava áreas de reabsorção (figura 15). A região interradicular (figura 16), e principalmente o corpo da mandíbula apresentava-se com evidente perda da massa óssea, cujos espaços eram ocupados por tecido medular ou fibroso, com aumento perceptível de osteoclastos.

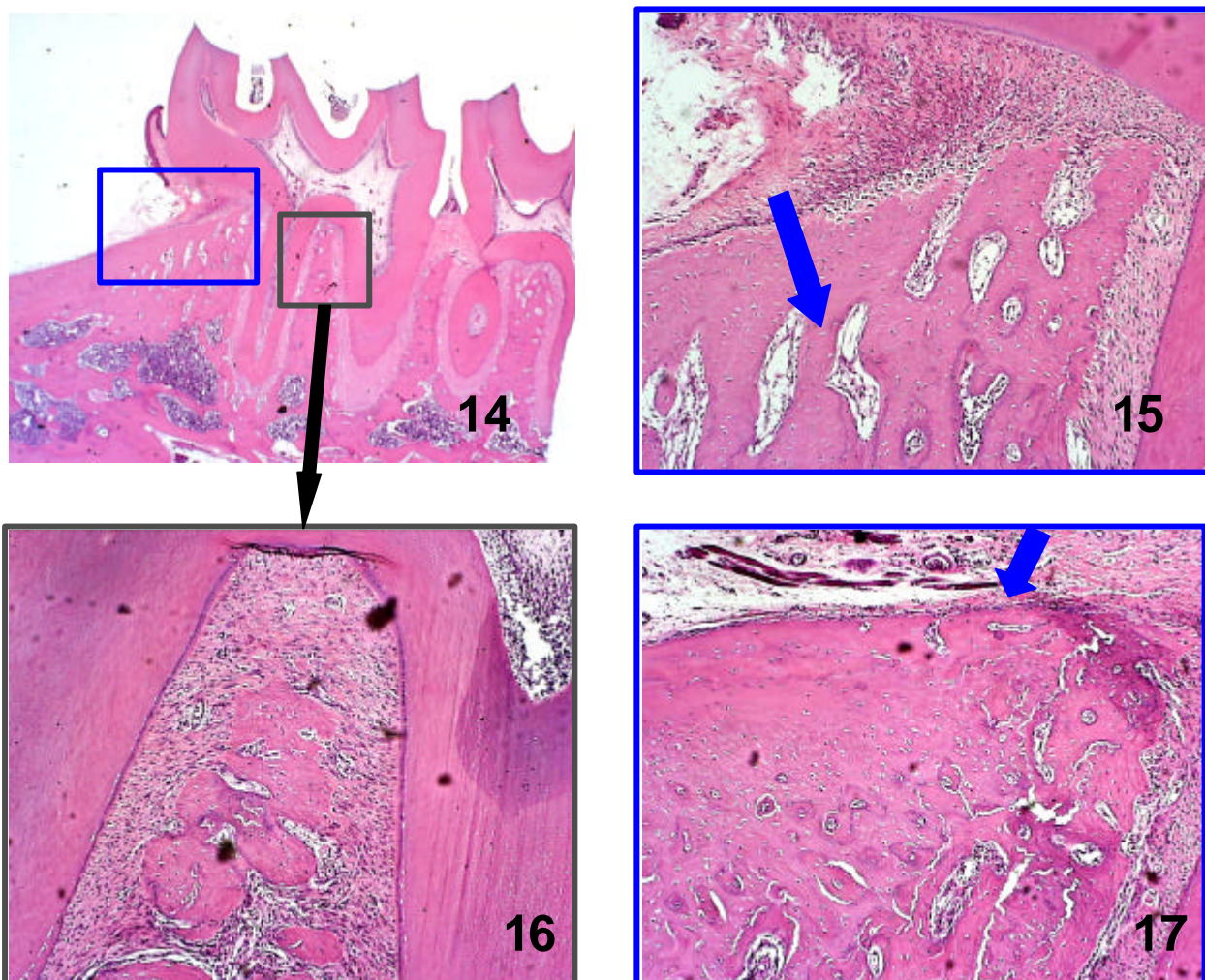


Fig 14 – Processo alveolar da região de primeiro molar inferior de rato submetido à indução de doença periodontal e tratado com CsA, mostrando as tábuas ósseas mesial e distal , gengival livre mesial e distal e área interradicular. Grupo 3. H.E. Aumento 2x/0,08.

Fig 15 – Destaque em maior aumento da fig.14, mostrando áreas de reabsorção óssea, principalmente na área de osso esponjoso, conservando a altura óssea. Grupo 3. H.E. Aumento 10x/0,4

Fig 16 – Destaque em maior aumento da fig.14, mostrando reabsorção óssea da região de osso interradicular. Grupo 3. H.E. Aumento 10x/0,40.

Fig. 17 – Maior aumento da porção mesial do processo alveolar do primeiro molar inferior, mostrando que a reabsorção óssea se dá principalmente na região de osso esponjoso, exibindo menores trabéculas ósseas, cujos espaços são ocupados pelo tecido mole. Grupo 3. H.E. Aumento 10x/0,40.

#### **5.2.4. Grupo 4**

Após 30 dias de tratamento com CsA todos os ratos apresentavam discreto aumento gengival. O aumento foi mais exuberante na face mesial dos primeiros molares. Observou-se perda da massa óssea em todas as regiões analisadas (figura 18).

O processo alveolar apresentava áreas de reabsorção, tanto na área de crista óssea quanto na área de tecido ósseo esponjoso (figura 19). A perda óssea era exuberante, nas regiões de corpo da mandíbula e interradicular (figura 20), cujos espaços com sinais de desorganização, porém em menores proporções que o grupo somente com ligadura, eram ocupados por tecido medular ou tecido fibroso. Alinhado e adjacente ao trabeculado ósseo, observava-se osteoblastos de morfologia similar ao encontrado no grupo controle. Por outro lado, observava-se maior concentração de osteoclastos acoplados em depressões ósseas.

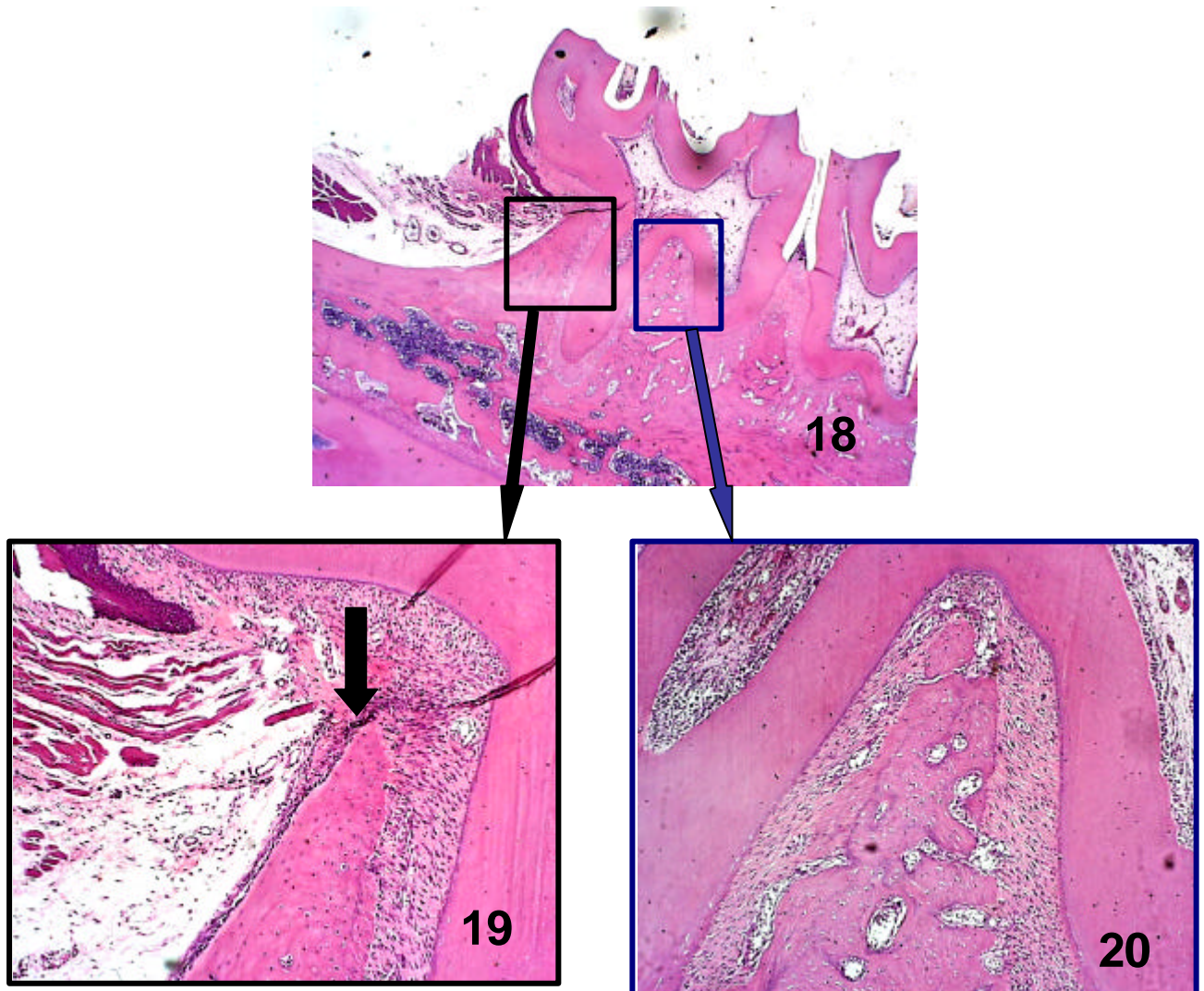


Fig 18 - Processo alveolar de primeiro molar inferior de rato tratado com CsA, mostrando as tábuas ósseas mesial e distal , gengiva livre mesial e distal e área interradicular. Grupo 4. H.E. Aumento 2x/0,08.

Fig 19 – Destaque em maior aumento da fig 18, mostrando integridade da altura da crista óssea. Grupo 4. H.E. Aumento 10x/0,40

Fig. 20 - Destaque em maior aumento da fig.14, mostrando reabsorção óssea da região de osso interradicular. Grupo 4. H.E. Aumento 10x/0,40.

### 5.3- Análise Histométrica

#### 5.3.1- Perda Óssea Alveolar

A tabela 3 e a figura 21 mostram a perda óssea alveolar medida em milímetros (mm), avaliada pela distância da JCE à crista óssea alveolar nas regiões mesial e distal dos primeiros molares inferiores. Quando comparado ao grupo controle, a distância da JCE à crista óssea alveolar de todos os grupos experimentais foram maiores.

Porém, no grupo 4 ocorreu uma menor perda óssea em relação aos grupos com ligadura (grupo 2 e 3). Já o grupo 2 obteve maior perda óssea, em relação ao grupo com ligadura e tratado com CsA (grupo 3), podendo sugerir uma diminuição na perda óssea pela atuação da CsA.

*Tabela 3* – Médias das medidas histométricas (mm  $\pm$  desvio padrão) da distância da JCE à crista óssea alveolar nas regiões mesial e distal dos 1<sup>os</sup> molares inferiores.

Grupos	Média $\pm$ desvio padrão
1 (n=6)	0,43 $\pm$ 0,05
2 (n=6)	1,14 $\pm$ 0,13 *#
3 (n=6)	0,89 $\pm$ 0,07 *◆
4 (n=6)	0,77 $\pm$ 0,06 *▲

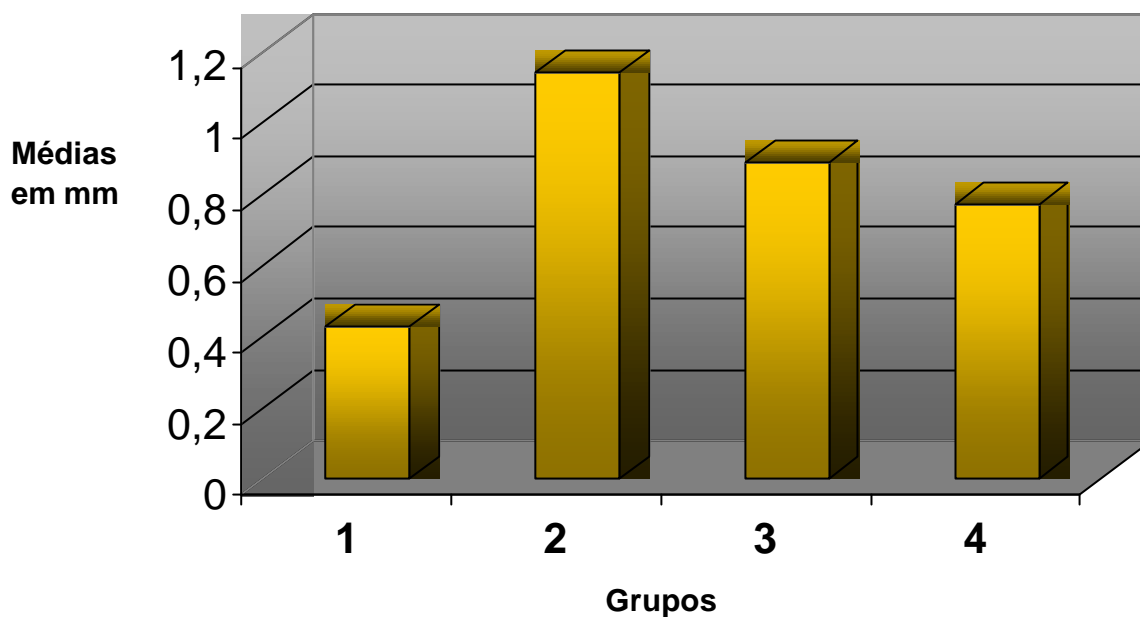
n corresponde ao nº de ratos por grupo.

\*Significativamente diferente do grupo controle (p<0,05).

# Significativamente diferente dos grupos tratados com CsA (p<0,05)

◆ Significativamente diferente do grupo submetido somente à periodontite experimental e do grupo submetido somente ao tratamento com CsA (p<0,05)

▲ Significativamente diferente dos grupos submetidos à periodontite experimental (p<0,05).



*Figura 21* – Medidas histométricas nas faces mesial e distal da perda óssea alveolar (mm) dos primeiros molares inferiores em relação aos vários tratamentos (ver tabela 3).

### **5.3.2- Área de tecido duro e Área de tecido mole**

A tabela 4 e a figura 22 mostram os resultados das medidas de área de tecido duro e tecido mole do processo alveolar na área de primeiro molar inferior. O grupo controle (grupo 1), apresentou, em média, a maior área de tecido ósseo e menor área de reabsorção. A associação entre ligadura e CsA (grupo 3) apresentou, em média, a maior área de tecido mole, quando comparada com os demais grupos, sugerindo uma maior reabsorção óssea na área de processo alveolar.

Os grupos 2 e 4 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si nas médias das áreas de tecido duro e mole.

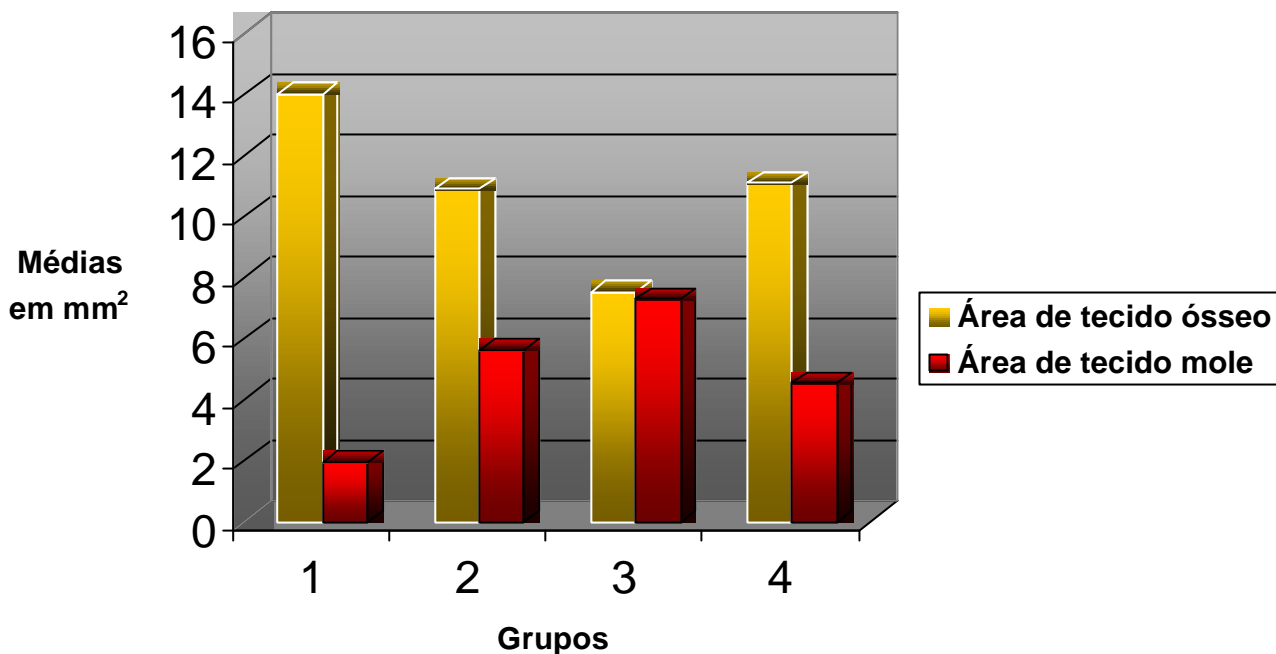
*Tabela 4* – Médias das áreas ( $\text{mm}^2 \pm$  desvio padrão) de tecido duro e tecido mole da região de processo alveolar dos 1<sup>os</sup> molares inferiores, delimitada em largura pelas porções externas dos tecidos gengivais e em altura pelos forames apicais, nos vários grupos

Grupos	Area de reabsorção	Area de tecido ósseo
1 (n=6)	1,95±1,17	14,02±1,48
2 (n=6)	5,62±1,91*	10,90±1,58*
3 (n=6)	7,29±1,42*#	7,53±2,38*#
4 (n=6)	4,52±0,94*	11,09±2,72*

n corresponde ao nº de ratos por grupo.

\* Significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ )

# Significativamente diferente do grupo submetido somente à periodontite experimental e do grupo submetido somente ao tratamento com CsA ( $p < 0,05$ )



*Figura 22* – Medidas das áreas de tecido mole e tecido duro do osso alveolar dos 1<sup>os</sup> molares inferiores, delimitada em largura pelas porções externas dos tecidos gengivais e em altura pelos forames apicais.

### 5.3.3- Espessura de Cimento

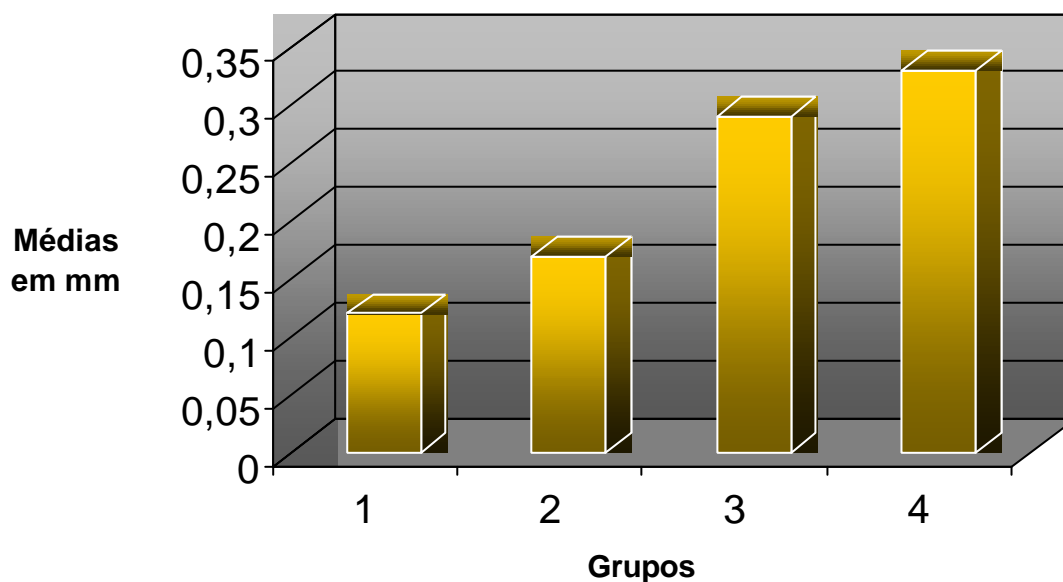
Os dados demonstrados na tabela 5 e figura 23 denotam que existe, em média, maior deposição de cimento nos grupos que receberam a CsA (grupos 3 e 4) em relação aos grupos não tratados com CsA (grupos 1 e 2), sugerindo, assim, estimulação da formação de cimento por parte da CsA.

*Tabela 5* – Médias das medidas histométricas (mm  $\pm$  desvio padrão) do cimento da região apical das raízes dos 1<sup>os</sup> molares inferiores em relação aos vários tratamentos.

Grupos	Média $\pm$ desvio padrão
1 (n=6)	0,12 $\pm$ 0,05
2 (n=6)	0,17 $\pm$ 0,05
3 (n=6)	0,29 $\pm$ 0,04*
4 (n=6)	0,33 $\pm$ 0,03*

n corresponde ao n<sup>o</sup> de ratos por grupo.

\* Significativamente diferente do grupo controle e do grupo submetido somente à periodontite experimental (p<0,05)



*Figura 23* – Médias das medidas da espessura de cimento (mm) realizadas nas raízes mesial e distal dos 1<sup>os</sup> molares inferiores.

#### 5.4- Estereometria do Processo Alveolar

No grupo controle, a densidade de osteoclastos ( $V_o$ ) na face mesial foi  $2,6 \pm 2,8\%$ . A densidade volumétrica de osteoclastos aumentou nos animais submetidos à periodontite experimental ( $18,1 \pm 8,1\%$ ), e foi mais pronunciado quando a periodontite experimental foi associada com a administração de CsA ( $20,6 \pm 3,2\%$ , grupo 3).

A relação de superfície reabsorvida/superfície óssea ( $Sr/So$ ), foi estatisticamente maior em todos os grupos tratados, quando comparado com o grupo controle. Os valores mais altos foram encontrados nos ratos submetidos à periodontite experimental e tratados com CsA ( $36,5 \pm 66$ ). Os valores para V-osso foram estatisticamente menores em todos os grupos tratados com CsA em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os menores valores para V-osso foram encontrados na associação da doença periodontal experimental e tratamento com CsA ( $0,45 \pm 0,02$ ). Resultados opostos foram observados em relação ao volume medular ( $p < 0,05$ ).

A tabela 6 mostra os valores da densidade volumétrica da osteoclastos multinucleados ( $V_o$ ), osso alveolar (V-osso), medula (V-medula) e relação de superfície óssea/superfície reabsorvida ( $So/Sr - \%$ ).

*Tabela 6*– Densidade volumétrica de osteoclastos (Vo), volume ósseo (V-osso), volume medular (V-medula) superfície reabsorvida/superfície óssea (Sr/So) do osso alveolar dos 1<sup>os</sup> molares inferiores dos ratos controles e ratos tratados com CsA e/ou doença periodontal experimental.

Grupos	V-osso	V-medula	Vo	Sr/So (%)
1 (n=6)	0,72±0,02	0,28±0,03	2,6±2,8	13,1±11,9
2 (n=6)	0,56±0,01*	0,44±0,01	18,1±8,1*	30,8±13,7*
3 (n=6)	0,45±0,02*#	0,55±0,02*#	20,6±3,2*#	36,5±6,6*#
4 (n=6)	0,65±0,01*	0,35±0,01*	15,5±4,3*	25,9±8,3*

n corresponde ao nº de ratos por grupo.

Todos os valores representam a média ± o desvio padrão.

\*Significativamente diferente do grupo controle (p<0.05)

# Significativamente diferente dos grupos experimentais (p<0.05)

### 5.5- Análise Estatística

O teste T'Student foi usado para determinar significância estatística entre os grupos com tratamentos e o grupo controle para todas as medidas de sangue e para os parâmetros estereológicos

Para as medidas da análise histométrica, foi utilizado a análise de variância (ANOVA), para verificar diferenças significantes entre os grupos. Devido a ocorrência de diferenças entre os grupos, foi utilizado o Teste Tukey para determinar as diferenças significantes entre pares de grupos. Estes dados foram aceitos como significantes com o p<0,05. Os resultados são dados com média + desvio padrão das médias.

## 6- DISCUSSÃO

É bem estabelecido na literatura pertinente, o protocolo de pesquisa usado neste trabalho, para a indução de doença periodontal em ratos (Sallum<sup>83</sup>, 1982; Nassar<sup>72</sup>, 2000; Holzhausen<sup>50</sup>, 2002).

O irritante gengival, representado pela ligadura, foi utilizado para que houvesse acúmulo de biofilme bacteriano, e conseqüentemente, o desenvolvimento da doença periodontal. A opção pela técnica utilizada, como preconizada por Johnson<sup>51</sup> (1975) e Sallum<sup>83</sup> (1982), ocorreu pela maior confiabilidade no desenvolvimento da doença periodontal.

A colocação da ligadura ao redor do primeiro molar inferior, modificou gradativamente as características macroscópicas da gengiva. No desenvolvimento da doença periodontal inflamatória, existe um fato repetidamente demonstrado e, sobre o qual, parece não existir qualquer sombra de dúvida: o acúmulo de biofilme nas superfícies dentais próximas à gengiva, é a causa direta da inflamação periodontal (Holzhausen<sup>50</sup>, 2002).

No presente trabalho, não avaliou-se quantitativamente e nem qualitativamente o biofilme bacteriano, assim como o grau de inflamação gengival.

A imunologia e a evolução do processo inflamatório da doença periodontal é importante por várias razões, tanto no impacto causado na compreensão dos processos biológicos básicos, quanto na aplicabilidade clínica, aprimorando o diagnóstico e tratando com sucesso as doenças periodontais inflamatórias. Por outro lado, é bem estabelecido que nem todos os acúmulos de biofilme levam ao desenvolvimento da doença periodontal, mesmo quando um grande número de patógenos periodontais estão presentes. Esses fatores levaram ao

reconhecimento de que outros fatores, além do biofilme, têm papel significativo na determinação da razão pela qual alguns indivíduos são mais susceptíveis do que outros à destruição periodontal (Wilson & Kornman<sup>104</sup>, 2001).

Sugere-se que a susceptibilidade à periodontite é complexa, visto que, múltiplos fatores precisam estar presentes para alterar significativamente a resistência do hospedeiro. Fortes evidências sugerem que deficiências imunológicas derivadas geneticamente são fatores de risco para a doença periodontal. É importante perceber que fatores de risco criados externamente também podem ter grande importância, em especial com relação à periodontite crônica (Wilson & Kornman<sup>104</sup>, 2001).

A resposta do hospedeiro às infecções periodontais pode ser afetada por uma combinação intrincada de fatores externos tais como, fumo, certos medicamentos, como os imunossupressores, presença de doenças sistêmicas debilitantes, estresse ou desnutrição, as quais, isoladamente ou em conjunto, podem modificar ou imunossuprimir os mecanismos imunológicos que compõe as defesas do hospedeiro (Wilson & Kornman<sup>104</sup>, 2001).

Entre as drogas imunossupressoras, a CsA é uma das drogas mais usadas nos casos de transplante de órgão. É apresentada para uso endovenoso e por via oral. Após a administração oral, a droga é absorvida do trato gastrointestinal e a absorção e biodisponibilidade absoluta desta substância, demonstra alta variabilidade inter-individual (Nagata<sup>71</sup>, 1996)

No presente trabalho a CsA foi administrada diariamente no tecido subcutâneo da região dorsal, na concentração de 10 mg/Kg de peso corporal, concentração essa baseada no trabalho de Wassef et al<sup>100</sup>. (1985), que mostrou

que a dose de 10 mg/Kg de peso corporal/dia é bem tolerada pelo rato, mantendo uma concentração sérica constante. Também baseou-se no trabalho desenvolvido por Spolidório<sup>89</sup> (1991), a partir do teste cutâneo de hipersensibilidade tardia provocado pelo DNCB (2,4 dinitroclorobenzeno), para a avaliação da resposta imunológica de ratos imunossuprimidos pela CsA. Os resultados obtidos mostraram baixos índices de positividade às reações cutâneas, confirmando que a dose de 10mg/Kg de peso corporal/dia é imunossupressora e bem tolerada pelo rato.

Em humanos adultos, a concentração da CsA no sangue para uma eficiente imunossupressão, em transplantes renais, corresponde a aproximadamente 4,5 a 10 mg/kg de peso corporal /dia (Daley et al.<sup>24</sup>, 1986).

Para se estabelecer a dose imunossupressora efetiva para cada indivíduo, o monitoramento sérico é importante, e pode ser feito através de radioimunoensaio ou cromatografia líquida de alta pressão (Buonpane<sup>16</sup>, 1990), o que não foi feito neste trabalho.

Os efeitos da CsA na gengiva têm sido extensivamente investigados (Seymour et al.<sup>87</sup>, 2000; Bolzani et al.<sup>11</sup>, 2000; Cotrim et al.<sup>19</sup>,2002). Relatos clínicos e experimentais subseqüentes mostram que, além do aumento gengival, a CsA pode alterar a homeostase do tecido ósseo (Fu et al.<sup>39</sup>, 2001; Bjoro et al.<sup>8</sup>, 2003) e do cemento (Ayanoglou & Lesty<sup>2</sup>, 1997; Ayanoglou & Lesty<sup>3</sup>; 1997; Ayanoglou et al.<sup>4</sup>, 1998; Ayanoglou<sup>5</sup>, 1999). Os efeitos da CsA sobre o osso alveolar, assim como na doença periodontal inflamatória tem recebido atenção limitada. Os efeitos da CsA sobre o tecido ósseo e o cemento têm apresentado

resultados conflitantes, assim como acontece com o aumento gengival (Erben et al.<sup>31</sup>, 2003).

Aumento da remodelação óssea e perda óssea trabecular foi observada em animais tratados com CsA (Movsowitz et al.<sup>70</sup>, 1988; Schlosberg et al.<sup>85</sup>, 1989), podendo estar acompanhada do número de osteoclastos, assim como, aumento da atividade osteoclástica em ratos tratados com CsA (Fu et al.<sup>38</sup>, 1999). Em trabalho subsequente, Fu et al.<sup>39</sup>, 2001 confirmaram que houve diminuição da massa óssea e da formação de superfície osteóide após tratamento de ratos com CsA.

Variações do efeito da CsA sobre o osso podem estar relacionadas com os diferentes tipos de ossos analisados ou protocolos experimentais desenvolvidos. Nesse sentido, variáveis como dose da CsA, gênero e idade teriam que ser levadas em consideração (Movsowitz et al.<sup>70</sup>, 1988; Fu et al.<sup>39</sup>, 2001; Shen et al.<sup>88</sup>, 2001; Erben et al.<sup>31</sup>, 2003)

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a indução da periodontite induzida pela ligadura por 30 dias, induziu perda de altura da crista óssea alveolar. Por outro lado, quando associou-se a indução da periodontite com tratamento com CsA, a perda desta altura foi menor. Esses dados confirmam os achados de Cox & Williams-Miller<sup>20</sup>, 1986; Cox et al.<sup>21</sup>, 1987 e Nassar<sup>72</sup>, 2000. Aventa-se a hipótese de que a CsA, inibindo a produção de IL-1, bloqueiam as atividades sobre os osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea, facilitando a maior deposição óssea (osteoblastia), como demonstraram "in vitro" Gowen & Mundy<sup>44</sup>, (1986). Esses dados explicam parcialmente os resultados do presente trabalho. Por outro lado, Cox & Williams-Miller<sup>20</sup>, 1986, concluíram que é possível que a

perda óssea induzida por ligadura seja mediada por outros mecanismos além da IL-2 e da atividade das células T, componentes sabidamente bloqueados pela CsA como discutido a seguir.

O mecanismo do efeito da CsA sobre o tecido ósseo é complexo e dentre outros certamente pode envolver o sistema imune. A atividade imunossupressora da CsA ocorre de forma seletiva nos linfócitos T CD4 positivos, inibindo a síntese de IL-2 e de outros mediadores da resposta imunológica (Thivolet<sup>99</sup>, 1990). Ela interage com um receptor citoplasmático solúvel, a ciclofilina. A estimulação dos receptores da células T por antígenos estranhos, resulta na ativação de uma via de transmissão de sinais através do citoplasma da célula, ativando fatores de transcrição específicos no núcleo dos linfócitos, chamado de fator nuclear das células T ativadas (NF-AT). A função do NF-AT, é regular a transcrição da IL-2, controlando sua síntese e secreção para o meio extracelular. A ação da CsA leva a uma inibição desta via de transmissão de sinais, impedindo a ligação NF-AT às regiões regulatórias do gene que codifica a IL-2, IL-3, IL-4 (Schreiber<sup>86</sup>, 1991; Kahan<sup>52</sup>, 1989; Suthanthiran & Strom<sup>95</sup>, 1994).

Em concordância com os achados de Cox & Williams-Miller<sup>20</sup> (1986), sugere-se que a perda óssea induzida pela CsA seja mediada, em parte, pela presença de linfócitos T, pelo fato de a CsA não induzir osteopenia em ratos com ausência de células T (Ratos Nude) (Buchinski et al<sup>15</sup>, 1996; Zahner et al. <sup>106</sup>, 1997). Em ratos, a CsA aumenta a expressão de IL-1 e IL-6, citocinas sabidamente envolvidas na proliferação de osteoclastos e conseqüente reabsorção óssea (MacDonald & Gowen<sup>64</sup>, 1992; Marshall et al. <sup>65</sup>, 1995). Tanto a proliferação de osteoclastos, quanto a osteopenia foram mostrados neste trabalho

através da avaliação estereométrica nos ratos tratados com CsA. Esses resultados são referentes a porção do corpo da mandíbula e estão de acordo com os achados de Fu et al.<sup>38</sup>, 1999; Shen et al.<sup>8</sup>, 2001; Movsowitz et al.<sup>70</sup>, 1988; Schlosberg et al.<sup>85</sup>, 1989; Katz et al.<sup>54</sup>, 1994; Klein et al.<sup>60</sup>, 1994. Surpreendentemente os dados obtidos da região de osso basal, são diferentes daqueles obtidos da medida da altura da crista óssea alveolar, onde a perda óssea era maior no grupo só com ligadura (grupo 2).

A localização ou a região analisada do osso também pode ser referencial para a avaliação do efeito da CsA. Verificou-se no presente trabalho, que nos períodos iniciais, a perda óssea foi maior na região interradicular e apical. A distribuição dos vasos sanguíneos na região do processo alveolar pode estar associado com as diferenças detectadas entre as regiões analisadas. Verificou-se que a região interradicular e apical, assim como as faces proximais ao ligamento periodontal são mais vascularizadas (dados não apresentados), onde ocorreram maiores perdas ósseas. É bem estabelecido que a formação óssea (osteogênese) depende de pré-requisitos indispensáveis, como por exemplo, o suprimento vascular (angiogênese) e conseqüentemente oxigenação (Floyd<sup>35</sup>, 1987; Bosse et al.<sup>13</sup>, 1994). Embora a ação da CsA sobre os vasos sanguíneos sejam extensamente estudados, a relevância da presença dessas estruturas nas reabsorções ósseas induzida pela CsA necessitam ser melhores avaliadas.

“In vitro”, a CsA inibe a proliferação, número, mitogênese, inserção e concentração de fosfatase alcalina dos osteoblastos, mas “in vivo” ela aparentemente aumenta o turnover ósseo. Tais diferenças podem estar no protocolo experimental usado, e sugere-se que o modelo animal seja mais

representativo por apresentar influência de múltiplas e complexas interações do sistema imune comparado com muitos fatores locais isolados estudados nos sistema "in vitro" (Movsowitz et al.<sup>70</sup>, 1988).

Acredita-se que em situações fisiológicas normais, a formação óssea e a progressão de reabsorção estão em equilíbrio, reguladas de modo que a reabsorção óssea pelos osteoclastos precedem uma nova formação óssea por osteoblastos (Cueto-Manzano et al.<sup>22</sup>, 1999). A presença de CsA, entretanto, induz a um desequilíbrio neste dinâmico ciclo de remodelação, com a reabsorção excedendo a formação, levando a osteopenia (Kawana et al.<sup>55</sup>, 1996). Os dados do presente trabalho mostraram que a associação do tratamento com CsA e a indução da doença periodontal pela ligadura apresentaram perda de altura óssea, com menor perda de altura nos animais tratados com CsA.

A análise bioquímica de marcadores de turnover ósseo correlatou bem com os achados histológicos. Os resultados do presente trabalho mostraram significativa diminuição no nível de cálcio sérico, que, de acordo com Mason<sup>67</sup>, 1990 e Ryffel<sup>82</sup>, 1986, poderia ser um efeito não-específico da CsA devido a um aumento da excreção pelo fígado, que é um dos principais órgãos afetados pela CsA. Outros experimentos com ratos tratados com doses similares às usadas no presente trabalho, causaram aumento de osteopenia sem mudanças nos níveis de cálcio ionizado, fosfatase ou paratormônio (Schlosberg et al.<sup>85</sup>, 1989; Rucinski et al.<sup>81</sup>, 1994). De acordo com prévios estudos (McCauley et al.<sup>68</sup>, 1992), verificamos diminuição (embora não significativa) no nível sérico de fosfatase alcalina, um marcador de fenótipos de osteoblastos (Wong et al.<sup>105</sup>, 1990), sugerindo um modesto efeito negativo da CsA na formação óssea. Assumindo que

a formação óssea é o dobro da reabsorção óssea, estes achados bioquímicos poderiam explicar o aumento significativo do grande número de osteoclastos e a porcentagem de superfície óssea reabsorvida, encontrada nos ratos com periodontite experimental associada ao tratamento com CsA no presente estudo.

Ainda com relação aos efeitos da CsA nos tecidos periodontais, o menos comentado é sua ação no cimento. Recentemente, estudos dos eventos biológicos associados ao processo de proliferação de estruturas em diversos tecidos, têm identificado e caracterizado diversos modificadores de resposta biológica capazes de regular a quimiotaxia, proliferação e até mesmo as funções secretoras dos diferentes tipos celulares, que eventualmente corroboraria para o entendimento de alguns processos regenerativos (Spolidorio<sup>91</sup>, 2003). De acordo com o presente trabalho, o cimento tem comportamento biológico diferente do tecido ósseo e dos tecidos gengivais, em ratos tratados com CsA.

No presente trabalho, os resultados mostraram que a administração de 10 mg/kg de peso corporal/dia de CsA, induz aumento na espessura do cimento, principalmente na região apical das raízes dos molares de ratos. Verificou-se uma significativa deposição cementária na região apical, diferente do que acontece com o tecido ósseo. Esses dados confirmam os achados de Spolidorio<sup>91</sup>, 2003, o qual verificou, em seu estudo, que houve deposição cementária em toda a extensão das raízes dentárias, mas a região apical foi a mais exuberante. Este autor, administrando CsA a 10mg/Kg de peso corporal/dia em ratos por diferentes períodos, verificou que o cimento dos ratos tratados com CsA, independente do período de tratamento, apresentaram-se mais espesso principalmente na porção apical e na porção média da raiz dos dentes analisados, sendo que em alguns

casos observava-se aumento da espessura cementária na região amelocementária (Ayanoglou & Lesty<sup>3</sup>, 1997).

Ayanoglou et al. <sup>1</sup>,1996, usando doses de 30 mg/Kg de peso corporal/dia em ratos tratados com CsA, verificou resultados contraditórios aos estudos descritos anteriormente, mostrando que a deposição de cimento se deu principalmente no terço cervical das raízes. Ayanoglou & Lesty<sup>4</sup>, 1997, em trabalho subsequente, relataram que apesar da deposição cementária ser exuberante no terço cervical, a deposição do cimento independe da superfície radicular, localização do dente (incisivos ou molares) ou idade, e depende em parte do tempo de tratamento com CsA. Este trabalho usando doses de 30 mg/Kg de peso corporal/dia em ratos tratados com CsA em diferentes períodos de tempo, mostrou que no período de 4 semanas houve aumento na deposição de cimento, mas esta deposição aumentava conforme era aumentado o tempo de administração da droga.

Mediante os resultados do presente estudo e dos trabalhos anteriormente relatados, podemos sugerir que a CsA aumenta a espessura de cimento, independente da superfície radicular; e talvez isto explique as diferenças de distância da JCE à crista óssea alveolar entre o grupo controle (grupo 1) e o grupo tratado somente com CsA (grupo 4), já que este aumento da espessura de cimento pode sugerir uma erupção passiva do dente e aumentar assim esta distância.

Enfim, deve-se salientar que independente do tecido analisado, outros trabalhos necessitam ser desenvolvidos para a exploração de vários aspectos

ainda não elucidados, na busca de bases científicas visando uma possível aplicação clínica.

## 7- CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos e dentro das condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que:

- 1- A CsA induz perda óssea principalmente na região basal das hemimandíbulas de ratos.
- 2- A CsA inibiu a perda de altura óssea alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura.
- 3- A CsA diminui os níveis de marcadores de formação óssea, embora em relação ao nível sérico de fosfatase alcalina, os grupos não tenham sido significativamente diferentes.
- 4- A CsA induz deposição cementária em toda a extensão da raiz dos molares, principalmente na região apical.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

- 1- AYANOGLU, CM et al. Cyclosporin A induces new cementum formation in the rat: a histological, morphometric and ultrastructural approach. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.75, p.1218, 1996.
- 2- AYANOGLU, C.M.; LESTY, C. Maintenance of new cementum formed during cyclosporin A administration after suspension of the treatment. **J Periodont Res**, Copenhagen, v.32, n.7, p.614-618, Oct.,1997.
- 3- AYANOGLU, C.M.; LESTY, C. New cementum formation induced by cyclosporin A: a histological, ultrastructural and histomorphometric study in the rat. **J Periodont Res**, Copenhagen, v.32, n.6, p.543-555, Aug, 1997.
- 4- AYANOGLU, C.M. Evidence that cyclosporin A administration induces the formation of new cementu-like islets inside the gingival connective tissue. **J Periodont Res**, Copenhagen, v. 33, p.166-171, 1998.
- 5- AYANOGLU, C.M. Phagocytosis of new cementum-like islets formed inside the gingival connective tissue in cyclosporin A treated rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 34, p. 65-69, 1999.
- 6- BARR, C.; LOPES, M.R.; RUA-DIBLES, A. Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.19, p.794-801, 1992.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 7- BEEN,V.; ENGEL,D. The effects of immunosuppressive drugs on periodontal inflammation in human renal allograft patients. **J. Periodontol.**, Chicago, v.53, p.245-8, 1982.
- 8- BJORO, K. et al. Secondary osteoporosis in liver transplant recipients: a longitudinal study in patients with and without cholestatic liver disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v.38, n.3, p.320-327, 2003.
- 9- BLAKE, G.M.; FOGELMAN, I. Bone densitometry, steroids and osteoporosis. **Curr. Opin. Nephrol Hypertens**, Philadelphia, v.11, n.6, p.641-647, 2002.
- 10- BOLTCHI, F.E.; REES, T.D.; IACOPINO, A.M. Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: A comprehensive review. **Quintessence Int.**, Illinois, v.30, p.775-783, 1999.
- 11- BOLZANI, G. et al. Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 35, n.1, p.51-58, Feb., 2000.
- 12- BOREL, J.F. Basic science summary. In: KAHAN, B. Cyclosporine nature of the agent and its immunologic actions. **New York. NY, Grune & Stratton**, 1988, cap.2, p.722-730, appud SPOLIDORIO, L.C. **Aspectos morfométricos e estereométricos do aumento gingival induzido pela CsA**. 1996. 169f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1996.
- 13- BOSSE, A. et al. Pericytes and vascular endothelial cell as potential osteoprogenitor cells. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v. 25, p.166-171, 1994.

- 14- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, appud SPOLIDORIO, L.C. **Avaliação morfológica e/ou estereométrica da gengiva marginal, processo alveolar e cemento de ratos tratados com ciclosporina**. 2003. 215f. Tese (Livre-Docência em Patologia Geral do Departamento de Fisiologia e Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- 15- BUCHINSKY FJ, et al. Bone mineral metabolism in T lymphocyte-deficient and -replete strains of rat. **J Bone Miner Res**, Washington, v.10, n.10, p.1556-1565, 1996.
- 16- BUONPANE, E. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. **Connecticut Medicine**, v.54, p.17-19, 1990, appud SPOLIDORIO, L.C. **Aspectos morfológicos e estereométricos do aumento gengival induzido pela ciclosporina-A**. 1996. 169f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1996.
- 17- CHOWDHURY, M.H.; SHEN, V.; DEMPSTER, D.W. Effects of cyclosporine A on chick osteoclasts in vitro. . **Calcif. Tissue Int.**, New York, v.49, p.275- 279, 1991.
- 18- CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. **Ann J. Med.**, v.94, p.646-650, 1993.
- 19- COTRIM, P. et al. Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)-beta 1 autocrine stimulation. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n.11, p.1313-1322, Nov., 2002.

- 20- COX, D.S.; WILLIAMS-MILLER, C. Ligature bone loss and cyclosporin-A in homozygous and heterozygous nude rats. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.65(abst.), p.331, 1986.
- 21- COX,D.S.; WILLIAMS-MILLER, C.; NADIB,T. Role of interleukin-2 in periodontal bone loss in the ligatede rat. **J. Periodontol.**, Chicago, v.58, p.130, 1987.
- 22- CUETO-MANZANO AM, et al. Bone loss in long-term renal transplantation: histopathology and densitometry analysis. **Kidney Int.**, Malden, v. 55, n.5, p.2021-2029, 1999.
- 23- CVETKOVIC M, et al. The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. **Transplantation**, Hagerstown,v.57,n.8, p.1231-1237, 1994.
- 24- DALEY, T.D. et al. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine induced gingival hyperplasia. **Oral Sur. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.62, p.417-421, 1986.
- 25- DELESSE, M.A. Procedé mécanique pour déterminer la composition des roches. **CR Acad Sce.**, v. 25, p. 544, 1848.
- 26- DEL POZO, E. Different effects of cyclosporin A on bone remodeling in young and adult rats. **Bone**, New York, v.16, n. 4 (Suppl), p. 271S-275S, apr., 1995.
- 27- DUARTE, P.J. et al. - Avaliação radiográfica da ação da CsA na evolução da doença periodontal. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**, 15, 1998. São Paulo, *Anais...* São Paulo: SBPqO, 1998, p.53,(Resumo 143).

- 28- DUNN, C.J. et al. Cyclosporin – An update Review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral) in organ transplantation. **Drugs**, Auckland, v. 61, n.13, p. 1957-2016, 2001.
- 29- EKELUND, A.L; NILSSON, OLLE. Effects of cyclosporin A on bone turnover and on resorption of demineralized bone matrix. **Clin Orthop.**, Philadelphia, v.326, p.127-134, May 1996.
- 30- EPSTEIN, S. Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v.11, n.1, p.1-7, Jan.1996.
- 31- ERBEN, R.G.et al. Skeletal effects of cyclosporin A are gender related in rats. **Endocrinology**, Baltimore, v.144, n.1, p.40 –49, Jan., 2003.
- 32- FIORE, C.E. et al. L-arginine prevents bone loss and bone collagen breakdown in cyclosporin A-treated rats. **Eur.J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.408, p.323-326, 2000.
- 33- FISCHER, R.G.; KLINGE,B. Clinical and histological evaluation of ligadure induced periodontal breackdown in domestic ferrets immunosupressed by cyclosporin A. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.21, p. 240-249, 1994.
- 34- FISCHER, R.G. et al. The effect of cyclosporin-A on the oral microflora at gingival sulcus of the ferret. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, p.853-860, 1996.
- 35- FLOYD, W.E. et al. Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine dista femoral epiphysis. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 69, n.2, p.185-190, Fe., 1987.

- 36- FORNONI, A. Cyclosporin A affects extracellular matrix synthesis and degradation by mouse MC3T3-E1 osteoblasts *in vitro*. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v.16, p.500-505, 2001.
- 37- FU, E. et al. Gingival overgrowth and dental alveolar alterations: Possible mechanisms of cyclosporin-induced tooth migration. An experimental study in the rat. **J Periodontol.**, Chicago, v. 68, p. 1231-1236, 1997.
- 38- FU, E. et al . Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. **J.Periodontol.**, Chicago, v.70, p.189-94, 1999.
- 39- FU, E. et al. A histomorphological investigation of the effect of cyclosporin on trabecular bone of the rat mandibular condyle. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.46, p. 1105-1110, 2001.
- 40- FU E, et al. Cyclosporin-induced gingival overgrowth at the newly formed edentulous ridge in rats: a morphological and histometric evaluation. **J Periodontol.**, Chicago, v.72, n.7, p.889-894, 2001.
- 41- GENCO, R.J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, n.4(Suppl), p.338-355, Apr. 1992.
- 42- GONÇALVES, P.F. **Influência da ciclosporina-A e nifedipina sobre a perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratos.** 2002. 89f. Tese (Mestrado em Clínica Odontológica na Área de Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2002.
- 43- GOODMAN, G.R. et al. Transforming growth factor- $\beta$  administration modifies cyclosporine A-induced bone loss. **Bone**, New York, v.28, n.6, 583-588, June 2001.

- 44- GOWEN, M; MUNDY, G.R. Activity of recombinant interleukin 1, interleukin 2, interferon- $\gamma$  on bone resorption in vitro. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 136, p.2478-2482, 1986.
- 45- GUGGENHEIM, B. The effect of cyclosporin A on periodontal disease in rats monoassociated with *Actinomyces viscosus*. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.16, p.26-38, 1981.
- 46- HALLMON, W.W.; ROSSMANN, J.A. The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. **Periodontology** **2000**, Munksgaard, v.21, p.176-196, 1999.
- 47- HEMMERLE, J.; FRANK, R.M. Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppressions in rats. **J. Biol. Buccale**, Paris, v.19, p.271-282, 1991.
- 48- HOFBAUER, L.C. 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**, Baltimore, v.140, n.10, p. 4382-4389, oct.1999.
- 49- HOFBAUER, L.C.; HEUFELDER, A.E. 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.**, Bethesda, v.87, n.7, p. 2355-2363, 2000.

- 50- HOLZHAUSEN M, **Efeito do celecoxib sobre o desenvolvimento de doença periodontal induzida em ratos.** 2002. 123f. Tese (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- 51- JOHNSON, J.H. Effects of local irritation and dextran and sulfhat administration on the periodontium of the rat. **J.Periodontal. Res.,** Copenhagen, v.10, p.332-45, 1975.
- 52- KAHAN, B.D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine. **Transplant. Proc.,** New York, v.21, p.9, 1989.
- 53- KAHNBERG, K.E.; LINDHE, J.; HELLDEN, L. Initial gingivitis induced by topical application of plaque extract. A histometric study in dogs with normal gingivae. **J. Periodont. Res.,** Copenhagen, v.11, n.4, p.218-225, Jul. 1976.
- 54- KATZ, I. et al. Influence of age on cyclosporin A-induced alterations in bone mineral metabolism in the rat in vivo. **J Bone Miner Res,** Washington, v.9, n.1, p.59-67, 1994.
- 55-KAWANA K, et al. The effect of cyclosporin administration on bone metabolism in the rat evaluated by biochemical markers. **J Endocrinol Invest,** Milano, v.19, n.8, p.499-504, 1996.
- 56- KEYES, P.H.; GOLD, H.S. Periodontal lesions in the Syrian hamster. I. A method of evaluating of bone resorption. **Or. Surg. Or. Med. Or. Path.,** St. Louis, v.8, p.492-499, 1955 appud HEMMERLE, J.; FRANK, R.M. Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppressions in rats. **J. Biol. Buccale,** Paris, v.19, p.271-282, 1991.

- 57- KEYES, P.H.; JORDAN, H.V. Periodontal lesions in the Syrian hamster. III. Findings related to an infections and transmissible component. **Archs. Oral Biol.**, Oxford, v.9, p.377-400, 1964 appud HEMMERLE, J.; FRANK, R.M. Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppressions in rats. **J. Biol. Buccale**, Paris, v.19, p.271-282, 1991.
- 58- KINANE, D.F.; JOHNSTON, F.A.; EVANS, C.W. Periodontitis modified by systemic factors. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.4, n.1, p.54-64, Dec. 1999.
- 59- KLAUSHOFER, K. et al. Ciclosporine A inhibits bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 243, p.584-590, 1987 appud FU, E. et al. Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. **J. Periodontol.**, Chicago, v.70, p.184-194, 1999.
- 60- KLEIN, L. Cyclosporin A does not affect the absolute rate cortical bone resorption at the organ level in the growing rat. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 55, p. 295-301, 1994.
- 61- LI, X.Q. et al. Differential patterns of incorporation and remodeling among various types of bone grafts. **Acta Anat.**, Basel Karger, v.140, p.236-244, 1991.
- 62- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, Chicago, v.36, p.177, 1965.
- 63- LUKERT, B.P.; RAISZ, L.G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.112, n. 5, p. 352-364, Mar.,1990.

- 64- MACDONALD, BR; GOWEN, M. Cytokines and bone. **Br. J. Rheumatol.**, Oxford, v.31, n.3, p.149-155, 1992.
- 65- MARSHALL, I. et al. Expression of interleukin-1 and interleukin-6 in bone normal and cyclosporin A treated rats. The XII International Conference on Calcium Regulating Hormones, Melbourne, Australia, **Bone**, New York, v. 16, 1995, appud SPOLIDORIO, L.C. **Avaliação morfológica e/ou estereométrica da gengiva marginal, processo alveolar e cemento de ratos tratados com ciclosporina.** 2003. 215f. Tese (Livre-Docência em Patologia Geral do Departamento de Fisiologia e Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- 66- MARSHALL R.I.; BARTOLD, P.M. Medication induced gingival overgrowth. **Oral Dis.**, Copenhagen, v.4, p.130-151, 1998.
- 67- MASON J. Renal side-effects of cyclosporin A. **Br J Dermatol**, Oxford, v.122,n.36(suppl), p.71-77, 1990.
- 68- MCCAULEY LK, ROSOL TJ, CAPEN CC. Effects of cyclosporin A on rat osteoblasts (ROS 17/2.8 cells) in vitro. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v.51, p.291-297, 1992.
- 69- MORSE, A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.24, p.143-153, 1945.
- 70- MOVSOWITZ C, et al. Cyclosporin-A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration. **Endocrinology**, Baltimore, v.123, n.5, p.2571-2577, 1988.

- 71- NAGATA, M.J.H. **influência da ciclosporina-A e do tempo da terapêutica sobre o alotransplante dental realizado em duas etapas cirúrgicas. Estudo histológico em macacos.** 1996. 125f. Tese ( Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 1996.
- 72- NASSAR, C.A. **Efeito da ciclosporina-A no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos.** 2000. 70f. Tese (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
- 73- NASSAR,C.A. et al. Avaliação radiográfica do efeito da ciclosporina-A no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.29, p.183-193, 2000.
- 74- NICKOLOFF, B. et al. Direct cytopathic effects of cyclosporine A on rapidly proliferating cultured keratinocytes and dermal fibroblasts. **Transplant. Proc.**, New York, v.20 (suppl 4), p.85-90, 1988.
- 75- OETTINGER-BARAK,O. et al. Periodontal changes in liver cirrhosis and post-transplantation patients. I: Clinical findings. **J. Periodontol.**, Chicago, v.72, p.1236-1240, 2001.
- 76- OETTINGER-BARAK,O. et al. Periodontal changes in liver cirrhosis and post-transplantation patients. II: Radiographic findings. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, p.313-316, 2002.
- 77- ORCEL, P. Cyclosporin A induces *in vivo* inhibition of resorption and stimulation of formation in rat bone. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v.4, n. 3, p. 387-391, Jun.1989.

- 78- OSHRAIN, H.I. et al. A longitudinal study of periodontal disease in patients with reduced immunocapacity. **J. Periodontol.**, Chicago, v.61, p.497-503, 1983.
- 79- PAGE, R.C., KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol.** 2000, Munksgaard, v.14, p.9-248, Jun. 1997.
- 80- PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab. Invest.**, Hagerstown, v.34, n.3, p. 235-249, Mar. 1976.
- 81- RUCINSKI B, LIU CC, EPSTEIN S. Utilization of cyclosporine H to elucidate the possible mechanisms of cyclosporine A-induced osteopenia in the rat. **Metabolism**, Philadelphia, v.43, n.9, p.1114-1118, 1994.
- 82- RYFFEL B. Cyclosporin. Toxicology--experimental studies. **Prog Allergy**, Basel Karger, v.38, p.181-197, 1986.
- 83- SALLUM, A.W. **Estudo da participação do trauma de oclusão na evolução da doença periodontal em ratos (Rattus norvegicus albinus)**. 1982. 180f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia , Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1982.
- 84- SASS, D.A. et al. Combined flurbiprofen and cyclosporin-A does not attenuate bone loss and exaggerates renal impairment. **Bone**, New York, v.19, p.381-386, 1996.
- 85- SCHLOSBERG M, et al. The effect of cyclosporin A administration and its withdrawal on bone mineral metabolism in the rat. **Endocrinology**, Baltimore, v.124, n.5, p.2179-2184, 1989.
- 86- SCHREIBER, S.L. Chemistry and biology of the immunophilins and the immunosuppressive ligands. **Science**, Washington, v.251, p.283-287, 1991.

- 87- SEYMOUR, R.A.; ELLIS, J.S.; THOMASON, J.M. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, p. 217-223, 2000.
- 88- SHEN, E.C.; FU, E.; HSIEH, Y.D. Effects of Cyclosporin A on dental alveolar bone: A histomorphometric study in rats. **J Periodontol.**, Chicago, v. 72, p.659-665, 2001.
- 89- SPOLIDORIO, L.C. **Efeito da ciclosporina-A sobre o processo de reparo em tecido cutâneo de rato.** 1991. 155f. Dissertação (Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1991.
- 90- SPOLIDORIO, L.C. **Aspectos morfométricos e estereométricos do aumento gengival induzido pela ciclosporina-A.** 1996. 169f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1996.
- 91- SPOLIDORIO, L.C. **Avaliação morfométrica e/ou estereométrica da gengiva marginal, processo alveolar e cemento de ratos tratados com ciclosporina.** 2003. 215f. Tese (Livre-Docência em Patologia Geral do Departamento de Fisiologia e Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- 92- STEIN, B. et al. Evidence that cyclosporine G is less deleterious to rat bone in vivo than cyclosporine A. **Transplantation**, Hagerstown, v.53, p.628-632, 1992.

- 93-STEWART, P.J.; GREEN,O.C.; STERN, P.H. Cyclosporine A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v.1, p. 285-291, 1986.
- 94-STEWART, P.G.; STERN, P.H. Cyclosporines: correlation of immunosuppressive activity and inhibition of bone resorption. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v.45, p.222-226, 1989.
- 95- SUTHANTHIRAN, M.; STROM, T.B. Renal transplantation. Review. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.331, n.6, p.365-376, Aug., 1994.
- 96- SWANGO, P.A. HIV periodontal health. A study of military personnel with HIV. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.122, p.49-54, 1991.
- 97- TEN CATE, A.R. Osso; Periodonto. In\_\_\_\_. **Desenvolvimento, estrutura e função**. 5ed. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan, 2001, caps. 12 e 13, p. 101-122 e 238-241.
- 98- THEILADE, E. et al. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.1, p. 1-13, 1966.
- 99- THIVOLET, J. et al. Effects of cyclosporin on bullous pemphigoid and pemphigus. **Lancet**, London, v.1, p.334-335, 1993.
- 100- WASSEF, R et al. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. **Transplantation.**, Hagerstown, v.40, p.489-93, 1985.
- 101- WEIBEL, E.R. Selection of the best method in stereology. **J microsc**, Oxford, v.100, p. 261-269, 1974.

- 102- WESTEEL, F.P. et al. Cyclosporine bone remodeling effect prevents steroid osteopenia after kidney transplantation. **Kidney Int.**, Malden, v.58, p.1788-1796, 2000.
- 103- WILMINK, J.M. et al. Bone repair in cyclosporin- treated renal transplant patient. **Transplant. Proc.**, New York, v.21, p. 1492-1494, 1989.
- 104- WILSON, T.G.; KORNMAN, K.S. **Fundamentos de Periodontia**. São Paulo: Quintessense Editora Ltda, 2001.
- 105- WONG, M.M., et al. Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. **J Bone Miner Res.**, Washington, v.5, n.8, p.803-813, 1990.
- 106- ZAHNER, M. et al. T-cells mediate a stimulatory effect of cyclosporin A on human osteoclastogenesis while immature osteoclast precursors are directly regulatory by glucocorticoids. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v.12, suppl.1, S198, 1997.
- 107- ZENI, S.N. et al. Olpradonate prevents the bone loss induced by cyclosporine in the rat. **Calcif. Tissue. Int.**, New York, v.70, p.48-53, 2002.

NASSAR, P.O. Avaliação do efeito da ciclosporina-A sobre o tecido ósseo de ratos com doença periodontal induzida por ligadura. Araraquara, 2003. 96f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

## 9- RESUMO

A administração da CsA tem sido associada a osteopenia ou aumento na remodelação óssea. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da CsA no processo alveolar de ratos com doença periodontal induzida, por meio de análises sérica, estereométrica, histológica e histométrica. 24 ratos foram divididos em 4 grupos de 6 animais cada: Grupo 1: Controle; Grupo 2: ligadura ao redor do 1º molar inferior; Grupo 3: ligadura ao redor do 1º molar inferior e tratamento com CsA a 10mg/Kg de peso corporal/dia; Grupo 4: tratamento com CsA a 10mg/Kg de peso corporal/dia. Após 30 dias os animais foram sacrificados e os níveis séricos de cálcio e fosfatase alcalina foram mensurados. Após análise histológica, uma análise histométrica da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar, da área de tecido ósseo e de reabsorção, mais espessura de cimento foi realizada conjuntamente com os parâmetros estereológicos: densidade volumétrica de osteoclastos multinucleados ( $V_o$ ), osso alveolar ( $V_{\text{osso}}$ ), medula ( $V_{\text{medula}}$ ) e relação de superfície reabsorvida/superfície óssea ( $Sr/So$ ) foram analisados na região mesial do osso alveolar. Diminuição significativa foi observada no cálcio sérico nestes grupos que receberam terapia com CsA. Não foi observada mudança significativa na fosfatase alcalina sérica. A terapia com CsA combinada

com ligadura diminuiu o V-osso e aumentou o Vo, V-medula e Sr/So na superfície mesial dos primeiros molares inferiores, dados esses concordantes com a análise histométrica e comprovada pela leitura histológica. Além disso a espessura de cimento foi aumentada nos grupos tratados com CsA em relação aos não tratados. Entretanto, apesar da falta de efeitos diretos na altura do osso alveolar, a terapia com CsA intensifica o desequilíbrio da homeostasia do osso alveolar em ratos com doença periodontal induzida.

NASSAR, P.O. Evaluation of effect of cyclosporin-A on the bone tissue with induced-periodontal disease to ligature in rats. Araraquara, 2003. 96f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

## 10- ABSTRACT

The administration of CsA has been associated with significant bone loss and increased bone remodeling. The present investigation was designed to evaluate the effects of CsA on alveolar bone of rats subjected to experimental periodontitis, using serum, stereometric and histological analysis. 24 rats were divided in groups 6 animal each: 1-control; 2-rats with ligature around the lower 1st.molars; 3-rats with ligature around the lower 1st.molars and were treated with 10mg/kg body weight/day CsA; 4-rats were treated with 10mg/kg body weight/day CsA. At the end 30 days, rats were sacrificed and calcium and alkaline phosphatase levels were measured. After histological processing, the histomorfometric analysis of the distance cemento-enamel junction and alveolar bone crest, bone area, eroded bone area and cemento surface together with stereological parameters: volume densities of multinucleated osteoclasts( $V_o$ ), alveolar bone( $V$ -bone), marrow( $V$ -marrow), and relation of eroded surface/bone surface( $Es/Bs$ ) were assessed at the mesial region of the alveolar bone. Significant decreases in serum calcium were observed in groups with CsA therapy. No significant changes in serum alkaline phosphatase were observed. The CsA therapy combined with ligature placement decreased the  $V$ -bone and increased the  $V_o$ ,  $V$ -marrow and  $Es/Bs$  at the mesial surface and the results at the histologic and

histomorfometric analysis showed the same combination and changes. Significant increase on the cemento height were observed in the CsA therapy groups. Therefore, in spite of the lack of a direct effect on the alveolar bone height, the CsA therapy intensified the imbalance of the alveolar bone homeostasia in a rat model of experimental periodontitis.