

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Hilson Fernando Resende Nogueira

**AVALIAÇÃO DO RANK NA PERIODONTITE
INDUZIDA EM RATOS PREVIAMENTE EXPOSTOS À
CICLOSPORINA A**

Taubaté - SP
2010

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Hilson Fernando Resende Nogueira

**AVALIAÇÃO DO RANK NA PERIODONTITE
INDUZIDA EM RATOS PREVIAMENTE EXPOSTOS À
CICLOSPORINA A**

Dissertação apresentada para obtenção de
Título de Mestre pelo Programa de Pós-
graduação em Odontologia do Departamento de
Odontologia da Universidade de Taubaté.
Área de Concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Hernandes
Ricardo

Taubaté - SP
2010

HILSON FERNANDO RESENDE NOGUEIRA

Data: _____, ____ de _____ de 2010

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Profa. Dra. _____ Universidade _____

Assinatura _____

A minha esposa Elene Maria e a minha filha Cecília,
por todo carinho, apoio e compreensão durante a ausência,
necessária à realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me permitiu chegar até esta etapa. Somente suas bênçãos me fizeram perseverar para concluir esta importante fase da minha vida.

Agradeço a minha família: minha esposa, Elene, pela força nos momentos decisivos, pela imensa contribuição e paciência nos momentos difíceis.

À minha filha Cecília que, mesmo tão pequenina, soube me motivar com seu olhar, com seu sorriso e com seu amor.

Aos meus pais Hilson e Vanda, que sempre me apoiaram e incentivaram de forma incondicional. Não tenho palavras para agradecer a confiança e o amor que depositaram sempre em mim.

Aos meus sócios César, Durval e Vitório e a suas famílias, por seu apoio e compreensão nos momentos de ausência.

À amiga, orientadora desta pesquisa Profa. Dra. Lucilene Hernades Ricardo, por seu grande exemplo de vida, dedicação e perseverança, pela atenção, aprendizado e apoio.

Agradeço ao professor Marcos Vinícius, por ter me motivado e guiado por este caminho. Sou grato por seus ensinamentos e por sua amizade.

À Profa. Dra. Sheila Cortelli, Coordenadora da Subárea Periodontia do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Taubaté, pela oportunidade de ingresso nessa tão respeitada instituição.

Aos professores do Mestrado, Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Taubaté, pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo profissionalismo e pela amizade constante.

Ao colega que de experimento Felipe da Silva Peralta.

Aos meus colegas e companheiros de Mestrado, com os quais compartilhei experiências e momentos felizes.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do Instituto Básico de Biociências da UNITAU, do Laboratório de Patologia Bucal da UNESP pela cooperação e ao apoio da FAPESP.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté, pela oportunidade de poder concluir o curso de mestrado.

Aos meus pacientes, objeto maior de todo meu trabalho, pela paciência e compreensão que tiveram comigo durante esta jornada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Nogueira HFR. Avaliação do RANK na periodontite induzida em ratos previamente expostos à Ciclosporina A [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2010. 92p.

RESUMO

O uso de ciclosporina A (CsA) tem sido associado com aumento na reabsorção óssea como efeito adverso. Porém, há controvérsia sobre quais mecanismos são responsáveis por esta associação. **Objetivo:** Este estudo investigou o efeito da exposição prévia a CsA sobre a expressão de RANK e perda óssea na periodontite experimental em ratos. **Método:** Quarenta ratos Wistar, com aproximadamente três semanas de idade, foram divididos em quatro grupos com dez animais cada: Grupo Controle (GC); Grupo CsA (GCsA), Grupo Ligadura (GL) e Grupo Ligadura e CsA (GCsAL). GCsA e GCsAL receberam doses diárias de CsA (10mg / kg) durante sessenta dias desde o início do experimento. Em GL e GCsAL, a ligadura foi colocada em torno do segundo molar superior direito, trinta dias após o início do experimento. Após sessenta dias os animais foram eutanasiados por perfusão cardíaca e as maxilas foram removidas e processadas para análise imunohistoquímica e histomorfométrica da remodelação óssea através da expressão da marcação do RANK (score) e perda óssea mensurada da junção cimento-esmalte à crista óssea (μm). Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância. **Resultados:** Os resultados da marcação de RANK não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,122$). Em relação à perda óssea, não foi observada influência significativa quanto à aplicação da CsA. GL ($735,88 \pm 121,82$) apresentou perda óssea significativamente superior ($p=0,01$) a GC ($569,13 \pm 89,76$) e, GCsAL ($759,38 \pm 198,23$) superior ($0,001$) a GCsA ($410,90 \pm 105,95$). **Conclusão:** Os resultados sugerem que a exposição prévia a CsA não influenciou a expressão de RANK ou a perda óssea na periodontite experimental em ratos.

Palavras-chave: Ciclosporina; Remodelação óssea; Periodontite.

Nogueira HFR. Evaluation of RANK induced periodontitis in rats previously exposed to Cyclosporine A [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2010. 92p.

ABSTRACT

The use of cyclosporin A (CsA) has been associated with increased bone resorption as adverse effect. However the mechanisms responsible for this association remains controversy. **Aim:** The study investigated the effect of prior exposure to CsA on expression of RANK and bone loss in experimental periodontitis in rats. **Methods:** Forty Wistar rats were divided into four groups with ten animals each: Control Group (CG) CsA group (GCsA), Group Ligation (GL) and Group ligated and CsA (GCsAL). GCsA and GCsAL received daily doses of CsA (10mg / kg) for sixty days from in the beginning of the experiment. In GL and GCsAL, ligature was placed around the upper right second molar, thirty days after in the beginning of the experiment. After sixty days the animals were euthanized by cardiac perfusion and the jaws were removed and processed for immunohistochemistry and histomorphometric analysis of bone remodeling through the expression of RANK marking (score) and bone loss measured from the cemento-enamel junction to bone crest (mm). Data were analyzed by Kruskal-Wallis test at 5% significance level. **Results:** The results of the marking of RANK showed no statistically significant difference between groups ($p = 0.122$). In relation to bone loss, there was no significant influence on the application of CsA. GL (735.88 ± 121.82) had significantly higher bone loss ($p = 0.01$) GC (569.13 ± 89.76) and GCsAL (759.38 ± 198.23) higher (0.001) GCsA (410.90 ± 105.95). **Conclusions:** The results suggest that prior exposure to CsA did not influence the expression of RANK in bone loss or periodontitis in rats.

Keywords: Cyclosporin; Bone Remodeling; Periodontitis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos grupos experimentais	62
Tabela 2 -	Valores dos pesos corpóreos dos animais (mg)	71
Tabela 3 -	Perda óssea lingual (μm)	72
Tabela 4 -	Análise da proporção espaço medular/trabecula óssea (%)	75
Tabela 5 -	Distribuição das marcações para rank	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação das doenças periodontais	25
Figura 2 -	Administração da csa por gavagem	63
Figura 3 -	Anestesia via intraperitoneal	64
Figura 4 -	Ligadura inserida no segundo molar superior direito	65
Figura 5 -	Realização da perfuração cardíaca	66
Figura 6 -	Remoção da maxila para o processamento histológico	66
Figura 7 -	Obtenção das imagens	67
Figura 8 -	Mensuração crista alveolar junção cimento/esmalte	68
Figura 9 -	Marcação imunohistoquímica do RANK	69
Figura 10 -	Peso corpóreo dos animais (mg) por grupo	72
Figura 11 -	Comparativo em grupos	73
Figura 12 -	Cortes histológicos descritivos dos grupos experimentais	74
Figura 13 -	Comparativo do Espaço Medular/Trabecular (%) por grupo experimental	75

Figura 14 -	Comparativo de expressão na marcação do RANK	77
Figura 15 -	Cortes histológicos corados pela imunohistoquímica para marcação de RANK	78

LISTA DE ABREVIações

ALP	Área do ligamento periodontal
CsA	Ciclosporina A
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DR	Densidade Radiográfica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Er β	Receptor Beta de Estrogênio
FA	Fosfatase alcalina
GCCG	Granuloma central de células gigantes
GC	Grupo controle
GCsA	Grupo Ciclosporina A
GCsAL	Grupo Ciclosporina A e ligadura
GL	Grupo Ligadura
GRx	Receptor glucorticóide X
CTR	Receptores afins da calcitonina
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
JEC	Junção esmalte – cimento
LLLT	Terapia a laser de baixo nível
LPS	Lipopolissacarídeo

MMPs	Metaloproteinases da matriz extracelular
NIF	Nifedipina
ODF	Fator de diferenciação de osteoclasto
OPG	Osteoprotegerina
PCNA	Antígeno nuclear de célula em proliferação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMNs	Polimorfonucleares
RANK	Receptor ativador de fator nuclear kappa - β
RANK-L	Ligante Rank
RNAm	RNA mensageiro
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRANCE	Citocina de ativação e indução relacionada ao fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O PERIODONTO E SUAS CARACTERÍSTICAS DE NORMALIDADE	18
2.2 PATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL	22
2.3 CICLOSPORINA "A" COMO FATOR DE RISCO PARA A DOENÇA PERIODONTAL	34
2.3.1 Pesquisa com Ciclosporina em animais	39
2.4 OSTEOCLASTO E A BIOLOGIA ÓSSEA	48
3 PROPOSIÇÃO	61
4 MÉTODO	62
4.1 ANIMAIS	62
4.2 ANÁLISE DO PESO CORPÓREO	63
4.3 TRATAMENTO	63
4.4 ANESTESIA	64
4.5 INDUÇÃO DA PERIODONTITE	64
4.6 EUTANÁSIA	65
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMETRIA	66
4.8 ANÁLISE DA DENSIDADE HISTOMORFOMÉTRICA DO OSSO	68
4.9 QUANTIFICAÇÃO DO RANK	68
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5 RESULTADOS	71
5.1 PESO DOS ANIMAIS	71
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO OSSO ALVEOLAR	72
5.2.1 Perda óssea lingual	72
5.3 DENSIDADE ÓSSEA	75
5.4 RANK	76
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXO	94

1 INTRODUÇÃO

A Ciclosporina A é um medicamento muito utilizado como imunossupressor em pacientes que receberam transplantes de órgãos. Devido a sua eficácia nessa área, seu uso vem se estendendo a outras aplicações na terapia médica, como por exemplo, ao líquem plano erosivo na Odontologia. Porém, efeitos colaterais adversos, como a osteopenia, vêm sendo associados a sua utilização, principalmente em terapias com tempo de uso prolongado e alta dosagem e em utilização concomitante com outros medicamentos.

A doença periodontal de etiologia multifatorial tendo como principal fator etiológico a presença de microorganismos específicos em um hospedeiro susceptível, está exposta a fatores de risco que podem interferir em seu início, evolução, terapia e prognóstico. Entre esses fatores de risco, pode-se citar a imunossupressão, como consequência da Ciclosporina A (CsA).

Há controvérsias quanto aos efeitos da utilização da CsA sobre os eventos biológicos de remodelação óssea. Nassar et al. (2003), em uma revisão da literatura, avaliaram a influência da CsA sobre o tecido do osso alveolar, analisando trabalhos *in vitro* e *in vivo*. Foram citados os trabalhos de McCauley et al. (1992), Stewart et al. (1989) e Klaushofer et al. (1987), cujos resultados da pesquisa *in vitro* demonstraram que a CsA aumentou a formação óssea; os resultados dos estudos *in vivo* foram contraditórios. Além disso, foram citadas pesquisas que demonstraram semelhança nos resultados entre os estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” (Wilmink et al., 1989; Li et al., 1991) e outras (Cueto-Mazano et al., 1999; Fu et al., 1999; Goodman et al., 2001; Zeni et al., 2002) que apresentaram resultados *in vitro* com diminuição da

osteoblastia e aumento na formação de osteoclastos, levando a uma maior reabsorção óssea.

Cetinkaya et al. (2006) investigaram os efeitos da CsA no osso alveolar em ratos e concluíram que houve diminuição da reabsorção e estímulo na formação de osso alveolar. Shen et al. (2001) utilizaram ratos tratados com CsA para elucidar sua ação no alvéolo dental, verificando que, após o uso do medicamento, houve um efeito inibidor na absorção sobre o alvéolo dental. Spolidorio et al. (2004) realizaram um estudo em ratos de diferentes idades, para avaliar se o uso da CsA ou da Nifedipina (NIF) afeta o metabolismo ósseo. Observaram, em seus resultados, a diminuição do volume ósseo alveolar, causada pela CsA e NIF isolado ou associado, independente da idade do animal. Contraditoriamente, Gonçalves et al. (2003) em seus trabalhos sobre perda óssea resultante da periodontite induzida por ligaduras em ratos e nos estudos com CsA associados ou não à NIF, concluíram que o uso de CsA não influenciou a perda óssea alveolar.

A quantificação da interferência de medicamentos em eventos biológicos de remodelação óssea na etiopatogenia da doença periodontal vem sendo objeto de investigação em estudos com a utilização de modelos animais. Nesses estudos, tem sido utilizado o rato como modelo de animal, devido à semelhança entre sua estrutura periodontal e a do homem (Klausen et al., 1989). Nos estudos de patogenia, os eventos biológicos associados à degradação dos tecidos periodontais têm sido descritos, relacionados à presença de diferentes moléculas e a fatores de crescimentos. Entre as moléculas estudadas, pode-se citar o ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANK), como marcador da biologia óssea.

Pesquisas associadas à presença de RANK e RANKL têm sido realizadas, com objetivo de relacionar essas moléculas à perda e à remodelação óssea, características da doença periodontal.

Nessa perspectiva, este trabalho busca associar os efeitos da CsA aos mecanismos de ação das proteínas RANK e RANKL na doença periodontal grave.

Com base nisso, questiona-se a influência da exposição à CsA, no que tange à reabsorção óssea e à presença de RANK na periodontite induzida por ligadura em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O PERIODONTO E SUAS CARACTERÍSTICAS DE NORMALIDADE

Etimologicamente, a palavra “periodonto” vem de *peri*, que significa em torno de, e “odonto”, que quer dizer dente. Chama-se, então, de periodonto aos tecidos de revestimento e de suporte dos dentes, o qual é sujeito a variações morfológicas e funcionais, além de alterações relativas à idade (Itoiz & Carranza, 1996).

O periodonto também é chamado de “aparelho de inserção” ou de “tecidos de suporte dos dentes”, porque tem como principal função inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter íntegra a superfície da mucosa mastigatória da cavidade bucal. Ele constitui uma unidade biológica e funcional que pode se modificar, ainda, por alterações ocorridas no meio oral (Lindhe et al., 2010a).

O periodonto é constituído por gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. Anatomicamente, a gengiva é dividida em: marginal, inserida e áreas interdentárias. A gengiva marginal (ou não-inserida) é a borda que circunda os dentes, em formato de colarinho. Geralmente, é delimitada pela gengiva inserida, por meio do sulco ou ranhura da gengiva livre e forma a parede de tecido mole do sulco gengival. A gengiva inserida situa-se continuamente à gengiva marginal. É firme, resiliente e se encontra fixamente aderida ao periósteo subjacente do osso alveolar. Sua face vestibular estende-se em direção à mucosa alveolar e sua largura é um parâmetro clínico importante. A gengiva interdentária ocupa o espaço interproximal localizado abaixo da área do contato dentário. Seu formato depende do ponto de contato entre dois dentes adjacentes (Itoiz & Carranza, 1996).

A gengiva e a junção mucogengival - parte do periodonto - formam-se durante a erupção do dente, quando se rompe o tecido conjuntivo entre o epitélio oral e o epitélio do esmalte. Da mesma forma, o cemento, o ligamento periodontal e a crista alveolar são estabelecidos durante a formação radicular e a erupção dental, criando, então, o que se chama de “união ectomesenquimal”. A junção amelocementária é um ponto de destaque do periodonto, tanto que a margem gengival e o osso alveolar marginal geralmente seguem a linha da junção amelocementária (Lindhe et al., 2010b).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo muito vascularizado, frouxo e celular, que circula a raiz dos dentes e une o cemento radicular ao osso alveolar ou à lâmina dura. É um ligamento continuado na direção coronária, com lâmina própria da gengiva, mas separado dessa por meio de feixes de fibras colágenas. Essas ligam a crista do osso alveolar à raiz (Lindhe et al., 2010a).

O cemento radicular é um tecido calcificado que acoberta a superfície radicular dos dentes e pequenas porções da coroa dos dentes. Tem características comuns ao tecido ósseo, não tem inervação, não sofre modulação nem reabsorção fisiológica. É constituído de fibras colágenas embutidas em uma matriz orgânica, e sua porção mineral é formada de cristais de hidroxiapatita, que responde por 65% de seu peso (Lindhe et al., 2010a).

Já o osso alveolar é definido como partes da maxila e da mandíbula que formam os alvéolos dos dentes e dão suporte a eles. O processo alveolar ocorre de forma associada ao desenvolvimento e à erupção dos dentes, sendo reabsorvido gradativamente quando os dentes são perdidos. Esse processo consiste em um osso que é formado pelas células do folículo dentário (que é o osso alveolar

propriamente dito) e por células não envolvidas do desenvolvimento dentário (Lindhe et al., 2010a).

Wolf et al. (2006) citam três estruturas do processo alveolar: o processo alveolar em si, o osso esponjoso e a compacta óssea externa, que recobre o processo alveolar. Quando o alvéolo se abre, a crista alveolar se transforma em lâmina ou córtex ósseo alveolar. Esse osso compõe a parede do alvéolo e mede cerca de 0,1 a 0,4mm de espessura; é cheio de pequenas cavidades pelas quais passam os vasos sanguíneos e as fibras nervosas. Entre a compacta óssea e o córtex ósseo alveolar está o osso esponjoso.

Sodek & Mckee (2000) afirmaram que o osso alveolar é uma parte especializada do osso mandibular e maxilar que forma o suporte primário da estrutura dentária. Embora fundamentalmente seja compatível com outros tecidos ósseos do corpo, o osso alveolar está sujeito à rápida remodelação associada à erupção dentária e, subsequentemente, às demandas funcionais da mastigação. A habilidade do osso alveolar na rápida remodelação é importante para a adaptação da posição dos dentes, mas isso pode ser prejudicado pela doença periodontal.

O osso alveolar remodela continuamente sua forma, devido às forças mecânicas dos dentes e as inflamações. Dessa forma, pode-se observar na superfície alveolar o seguinte: síntese óssea, com áreas cobertas por osteoblastos cuboidais que secretam a matriz óssea; reabsorção, com áreas de osso cobertas por osteoclastos multinucleados que reabsorvem o osso; áreas sem capacidade de síntese ou de reabsorção, com o osso coberto por células achatadas (Ryder, 2007).

A utilização de modelo animal para estudo do periodonto e da patogenia da doença periodontal tem sido descrita na literatura como eficaz na observação de

eventos biológicos que modulam as respostas teciduais frente a diferentes fatores de risco ou terapias para doença periodontal.

Klausen et al. (1989) afirmaram que a estrutura periodontal do homem é semelhante à estrutura dos ratos, razão pela qual esses animais são adequados a pesquisas envolvendo questões periodontais. Além disso, os ratos podem facilmente ser mantidos em condições estéreis, possibilitando o estudo patogênico de elementos isolados da complexa microbiota periodontal. Do mesmo modo, a existência de uma imunodeficiência congênita nos ratos torna-os um modelo para estudos que envolvam reações do hospedeiro às doenças periodontais. Esses autores investigaram a perda óssea do periodonto em 25 ratos, com o objetivo de testar a reprodutibilidade dos métodos morfométrico e radiográfico e descrever a correlação entre eles. O nível de perda óssea foi verificado microscopicamente, medindo-se a distância da junção do cimento/esmalte da crista do osso alveolar em 36 sítios bucais de cada animal. A radiografia do osso da mandíbula dos 25 ratos foi obtida a partir do primeiro molar, da seguinte forma: ápice da raiz distal, cúspide distal e profundidade distal do defeito ósseo do dente. As medidas foram tomadas de forma cegada e repetidas em ocasiões diferentes. A conclusão foi de que a reprodutibilidade de ambos os métodos foi alta, concordando quanto à detecção do nível do osso periodontal e dos diferentes tipos de lesão periodontal, caracterizando este método de avaliação como adequado para a quantificação da alteração óssea decorrente da doença periodontal.

Page & Schroeder (1982) se referiram à periodontite em ratos, considerando que sua estrutura oral e fisiológica, bem como a patogênese das doenças periodontais, é mais semelhante à do ser humano do que a de outros roedores e/ou animais. Embora particularmente os tecidos dentários e periodontais sejam

diferentes em tamanho entre os vários tipos de ratos, os princípios estruturais e fenomenológicos do crescimento são idênticos. Os ratos possuem uma dentição típica de roedores; os molares são completamente erupcionados entre o 15º e o 40º dias de nascimento, conforme o tipo de rato. Eles têm servido amplamente para pesquisas relacionadas com humanos devido às características de seu periodonto, particularmente as da área dentogengival e das mudanças nas regiões molar. São semelhantes aos do homem principalmente os seguintes itens: estrutura da área dentogengival, inclusive a do epitélio juncional e área adjacente à superfície dentária; configuração e topografia dos tecidos epiteliais na gengiva marginal; a pouca profundidade do sulco gengival na base da superfície do epitélio juncional e no nível da gengiva marginal. Assim, tanto em roedores como em humanos, o epitélio juncional é o caminho para o fluxo de substâncias estranhas e para a exsudação de células inflamatórias.

2.2 PATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL

A microbiota da cavidade oral constitui um sistema ecológico complexo, no qual a saliva estéril vem das glândulas salivares e lava as superfícies na boca, passando por muitos locais; assim, dá lugar à proliferação microbiana. Como se trata de um sistema aberto, o fluxo da saliva é muito grande; dessa forma, na cavidade oral somente permanecem os microorganismos que conseguem ficar retidos. No entanto, não é somente o fluxo da saliva que remove as bactérias das superfícies bucais, mas também o fluxo do fluido gengival, a mastigação, os métodos de higiene oral e a descamação das células epiteliais da mucosa. Além disso, os fatores envolvidos na aderência dos microorganismos à superfície da cavidade oral são

também importantes, bem como a relação nutricional entre hospedeiro e microorganismos (Lindhe et al, 2010b).

A doença periodontal é definida como uma afecção inflamatória e imunológica crônica que se estabelece como uma resposta a antígenos periodonto e patogênicos. É decisiva na proteção à infecção e pode ocasionar alterações patológicas no tecido do hospedeiro. A patogênese da doença periodontal resulta de uma relação complexa entre os microorganismos presentes no biofilme e a resposta do hospedeiro (Martins & Russo, 2004).

Vários fatores do hospedeiro contribuem decisivamente para a evolução da periodontite, além da presença de microorganismos específicos. Entre aqueles fatores, encontram-se as respostas imunes ocasionadas por patógenos; as reações de defesa podem não ser adequadas e causar a destruição dos tecidos. As reações imunes são determinadas pela genética e por fatores de risco individuais, que respondem pelo surgimento, pelo grau de severidade e pela velocidade da progressão da doença periodontal (Wolf et al., 2006).

Inicialmente, a inflamação se caracteriza como uma resposta aguda que muitas vezes se torna crônica e tem como consequência a destruição do osso e do tecido conjuntivo de suporte, a qual é associada à resposta imune aos patógenos periodontais. A doença periodontal pode evoluir até a perda total do osso de sustentação e do ligamento periodontal (Van Dyke, 2007).

A forma como o hospedeiro responde à patogênese tem um papel fundamental na doença periodontal, porque, ou contribui para o estabelecimento da doença ou regula os efeitos das bactérias. Nas doenças periodontais, vários componentes do sistema imune são ativados; neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos variam segundo a condição de saúde ou doença dos tecidos. Também

são importantes os anticorpos locais, sistêmicos e o complemento das bactérias orais, pois podem influenciar a colonização e a invasão bacteriana, a destruição tecidual, a cicatrização e a fibrose. Grande parte das substâncias produzidas pelos microorganismos da placa bacteriana e liberadas por eles é antigênica e desencadeia reações imunológicas, as quais são mediadas por células ou por anticorpos. Dessa forma, as respostas imunes tanto podem ser benéficas como podem ser injuriosas (destrutivas) (Duarte et al., 2000).

Uma lesão periodontal ativa se caracteriza pela infiltração de células B e T, que são os principais linfócitos imunes. O que torna a doença periodontal diferente de outras doenças infecciosas crônicas é a ocupação de 50-60% de tais infiltrações celulares por células plasmáticas. As células B produzem anticorpo que ataca as bactérias e protege o organismo da infecção. A consequência da infiltração de células B localizada na gengiva faz com que os pacientes com doença periodontal fiquem com altos níveis de anticorpos ao redor dos tecidos gengivais (Kawai et al., 2006).

A resposta imune inata ao processo inflamatório tem início com o acúmulo de microorganismos, constituindo uma resposta inespecífica que se caracteriza por microvascularizações locais, com aumento do fluxo sanguíneo, da pressão hidrostática capilar e da permeabilidade vascular. Em seguida, vem a migração de leucócitos, de proteínas e de líquido do meio intravascular para o espaço extravascular, local da injúria. Quando os patógenos específicos superam os elementos inatos de defesa e permanecem mais tempo no local, desenvolve-se a resposta imune adaptativa. Essa resposta adaptativa se divide em imune celular e humoral, com os linfócitos T e B e os plasmócitos dominantes nessa fase. A degradação do colágeno é também conhecida como via extracelular e regulada por

citocinas que são liberadas no processo inflamatório. A degradação se desloca no sentido da profundidade e segue em direção ao tecido ósseo. Quando o foco da inflamação permanece predominantemente nas áreas de adesão do cimento, ocorre a perda da inserção do conjuntivo periodontal; mas quando o foco se dá perto da crista alveolar, ocorre a reabsorção óssea (Martins & Russo, 2004).

A extensão da doença periodontal corresponde a uma descrição de sua localização e distribuição na cavidade oral, podendo ela ser generalizada ou localizada. O estágio da doença periodontal no geral pode ser caracterizada como leve, moderada ou severa, embora se use algumas vezes os termos suave ou inicial (em vez de leve) e os termos severa e avançada são usados alternadamente. A severidade deve ser caracterizada conforme a perda de inserção clínica em: 1 a 2mm – leve; 3 a 4mm – moderada; maior ou igual a 5mm – severa. A medida deve ser feita com uma sonda periodontal, da junção cimento-esmalte até a base do sulco passível de sondagem; 5mm significa 40% de inserção periodontal (Wolf et al., 2006).

Wolf et al. (2006) apresentam a classificação das doenças periodontais divulgadas internacionalmente em 1999 (Figura 1).

I. Doenças gengivais (induzidas ou não por placa bacteriana)
II. Periodontite crônica (localizada ou generalizada)
III. Periodontite agressiva (localizada ou generalizada)
IV. Periodontite como manifestação de doenças sistêmicas (associada a várias desordens)
V. Doenças periodontais necrosantes (gengivite ulcerativa e periodontite ulcerativa)
VI. Abscessos periodontais (gengivais, periodontais e pericoronários)
VII. Periodontite associada a lesões endodônticas
VIII. Deformidades adquiridas (relacionadas ao dente, mucogengivais e ao redor dos dentes, mucogengivais e das cristas edêntulas, trauma oclusal)

Figura 1 - Classificação das doenças periodontais: Tipo I à VIII

A periodontite agressiva é causada pela presença de bactérias como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, a *Porphyromonas gingivalis*, a *Bacteróides forsythus* e a *Treponema denticola*. O fator genético foi incluído na etiologia na periodontite agressiva, inclusive observando-se um padrão familiar de perda óssea alveolar. Page & Schroeder (1982) analisaram uma família composta por seis indivíduos (pai, mãe e quatro filhos), sendo encontrada a doença periodontal agressiva em quatro deles, à exceção da criança de cinco anos (Hepp et al., 2007).

Cortelli et al. (2009) investigaram a presença do *Streptococcus mutans*, do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, do *Campylobacter rectus*, do *Prevotella intermedia*, do *Porphyromonas gingivalis* e do *Tannerella forsythia* na gengiva de uma amostra constituída de 196 crianças. Eles buscavam verificar se alguns desses patógenos podiam ser mais associados à extensão da inflamação gengival e ao índice de perda dentária. O estudo foi feito com sujeitos que apresentavam placas num índice acima de 80%, os quais foram divididos em grupos, conforme o nível de sangramento: baixo ($\leq 30\%$), médio (31-59%) e alto ($\geq 60\%$). A presença de cada patógeno foi determinada por PCR. A prevalência do *Streptococcus mutans* foi de 71,9% e a média de perda dentária foi de 6.68. A prevalência quanto ao baixo, médio e alto sangramento foi de 43.5%, 34.5% e 46.7% para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; de 43.5%, 37.9% e 36.7% para *Campylobacter rectus*; 99.1%, 100% e 96.7% para *Porphyromonas gingivalis*; 56.5%, 56.9% e 66.7% para do *Prevotella intermedia*; 58.3%, 60.3% e 56.7% para a *Tannerella forsythia*, respectivamente. *Porphyromonas gingivalis* foi o patógeno mais prevalente. A presença de *Prevotella intermedia* foi associada à inflamação ($P < 0.05$), enquanto *Campylobacter rectus* ($P < 0.05$) foi relacionada com a saúde periodontal.

Os roedores podem ser objeto de investigação prospectiva quanto aos aspectos microbiológicos e imunológicos da doença periodontal. A anatomia periodontal, o desenvolvimento e a composição da placa dentária, a histopatologia das lesões periodontais e a imunobiologia básica dos ratos é semelhante à do homem. As maiores diferenças são a remodelação do osso alveolar e a tendência à impactação de pelos, cuja quantidade pode influenciar no próprio desenho ósseo. Mas pelas semelhanças, métodos que avaliam o desenvolvimento da doença periodontal e detectam a destruição periodontal podem ser usados de forma induzida em ratos, em poucas semanas, sem trauma nos tecidos periodontais com ligamentos. Estudos experimentais de periodontite em ratos estéreis confirmaram o efeito negativo de patógenos periodontais suspeitos, como *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, entre outras. Esses estudos também sugeriram que o número de patógenos periodontais pode ser muito mais alto do que se acredita, porque as espécies *Streptococcus sobrinus* e *Actinomyces viscosus* são associadas à perda do osso periodontal em ratos. Estudos realizados com ratos com problemas imunológicos congênitos ou induzidos indicaram que a imunossupressão generalizada ou seletiva no momento da infecção por patógenos periodontais pode agravar a doença periodontal. A imunossupressão em ratos pode agravar a doença periodontal e que experimentos com a imunização em ratos indicam que a periodontite pode ser prevenida pela imunização de patógenos periodontais (Klausen, 1991).

Itoiz & Carranza (1996) afirmaram que uma causa comum na perda óssea na doença periodontal é a extensão do processo inflamatório, o qual é estimulado por toxinas e pela pressão dos fluidos inflamatórios. O aumento da vascularização, associado à inflamação, também pode causar reabsorção óssea, devido à

estimulação do aumento de osteoclastos e à elevação da tensão de oxigênio local. Com o pH diminuído pelo processo inflamatório, a reabsorção óssea é afetada.

Na doença periodontal, geralmente a destruição óssea é causada por fatores locais, embora possa também ser causada por fatores sistêmicos. Geralmente, a altura do osso alveolar se mantém devido ao constante equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Esse equilíbrio sofre influências locais e sistêmicas, ou seja, a perda óssea na doença periodontal não é só um processo destrutivo, mas também é causada pelo desequilíbrio entre reabsorção e formação. A nova formação óssea retarda a velocidade do processo de perda óssea, de certa forma compensando o osso destruído com a inflamação; o osteóide resiste mais à reabsorção que o osso mais velho. Como há uma interação entre reabsorção e formação óssea, a perda óssea nem sempre é contínua, isto é, seu processo é progressivo, mas sua velocidade não é previsível. A altura do osso só diminui quando a reabsorção ultrapassa a formação. Dessa forma, na doença periodontal, a perda óssea pode causar: aumento da reabsorção diante da formação normal ou aumentada; diminuição da formação diante da reabsorção normal e aumento da reabsorção combinado com a formação diminuída (Itoiz & Carranza, 1996).

Na doença periodontal, a perda óssea se dá devido ao desequilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos, causando a reabsorção osteoclástica. Esse processo ocorre pela ação de fatores locais sobre o osso alveolar, tanto etiológicos como sistêmicos. Não se trata de uma doença óssea propriamente, porque o osso não está infectado, nem há um processo de necrose. A perda óssea ocorre em consequência da resposta imune inflamatória do hospedeiro aos agentes etiológicos (Marcos, 1980).

A destruição do osso alveolar, efeito da periodontite progressiva é uma das maiores causas da perda de dentes em humanos, é mediada pela imunidade do hospedeiro e pela resposta inflamatória do desafio microbial. Em décadas recentes, estudos sobre mecanismos celulares e moleculares da perda óssea na periodontite têm sugerido que o uso de agentes hospedeiros moduladores é importante como terapia complementar para as estratégias antimicrobiais (Qiming et al., 2007).

Uma pesquisa desenvolvida por Itoiz & Carranza (1996) demonstrou que a prostaglandina, injetada intraderme, provoca alterações vasculares que são observadas na inflamação. Já quando é injetada na superfície óssea, provoca a reabsorção óssea se não houver células inflamatórias e osteoclastos; também pode aumentar a síntese de prostaglandinas pelo osso, induzindo à reabsorção óssea. Com isso, confirma-se que, na perda óssea periodontal, há componentes imunomediados.

Foi comprovado que linfócitos T são associados à regulação da reação inflamatória, e os linfócitos B são associados à produção de anticorpos e de citocinas. A perda óssea na periodontite é mediada por osteoclastos, e as células que primeiro produzem o aspecto que modifica os osteoclastos para lesões periodontais são os linfócitos T e B (Van Dyke, 2007).

Em uma revisão da literatura, Santos et al. (2009) discutiram a influência de imunossupressores no metabolismo ósseo e no movimento dentário na Ortodontia. A movimentação se dá devido ao processo de remodelação óssea e do ligamento periodontal. Medicamentos como os imunossupressores são capazes de afetar o metabolismo ósseo e o nível de movimentação dentária. Mas como eles agem reprimindo a ação dos linfócitos T pode causar perda óssea e até um quadro de

osteoporose, doença comum principalmente em pacientes transplantados de coração, de fígado e de pulmões.

Teitelbaum et al. (1997) descreveram os mecanismos moleculares da diferenciação osteoclástica e os meios pelos quais a célula degrada a matriz óssea. O osteoclasto é uma *polykarion* fisiológica e a maior célula óssea exclusiva de reabsorção. Ele participa da remodelação, do reparo e do desenvolvimento ósseo, bem como da mobilização de minerais nas demandas homeostáticas. Mais importante, a osteoporose, doença endêmica, é sempre um reflexo da atividade osteoclástica na formação óssea por osteoclastos. Todas as formas de terapia contra a osteoporose advêm do sucesso referente à inibição da reabsorção óssea osteoclástica. A reabsorção óssea é regulada tanto pelo recrutamento de precursores osteoclásticos em polykarions reabsorvíveis, como pela modulação da taxa na qual os osteoclastos maturam.

Souza et al. (2005) avaliaram a característica anatômica do osso alveolar de ratos por meio de radiografias e do método morfométrico. Os trinta ratos da amostra foram eutanasiados, e suas mandíbulas e maxilas do lado direito foram colocadas em formol a 10%. A análise do material foi feita com lupa estereoscópica, para determinar o nível ósseo das faces livres. Foram realizadas duas mensurações do suporte ósseo periodontal, junto às proximais: distal e mesial, por meio de radiografias, e os dados foram estatisticamente avaliados pelo teste ANOVA, com uma significância de 5%. O teste t pareado não demonstrou diferença estatística ($p > 0.05$) nas mensurações realizadas. O resultado do suporte ósseo periodontal não apresentou diferença estatística entre as raízes mesial e distal, nem entre os arcos. Porém, no nível ósseo alveolar, a raiz distal da mandíbula apresentou-se menor em relação às outras, e na maxila, as raízes linguais apresentaram-se maiores que nas

vestibulares. Comparadas entre si, mandibulares e maxilares, os valores das primeiras foram estatisticamente superiores, concluindo-se que, nos ratos, a anatomia do periodonto dos molares apresenta níveis ósseos distintos, embora o suporte periodontal ósseo seja proporcionalmente equivalente.

Amadei et al. (2006), em uma revisão da literatura, apresentaram os principais aspectos da remodelação e reparação óssea associados à deficiência do estrogênio. Na remodelação, o osso apresenta um processo contínuo, podendo algumas doenças, como a osteoporose, causar alguma anormalidade; na reparação, o processo envolve uma cascata complexa de respostas biológicas, sendo afetado por fatores locais e externos e regulado pela interação de mecanismos diferentes. O aumento ou a diminuição da capacidade de reparação óssea são relacionados com alterações durante a remodelação. Na deficiência e no metabolismo ósseo, a maioria dos autores defende que há redução da capacidade de remodelação e de reparação do tecido.

Binde et al. (2009) compararam e analisaram histologicamente o comportamento do periodonto de vinte ratas, estudo de boca dividida, com indução da doença através de ligadura na cervical no primeiro molar inferior esquerdo. Após 56 dias os animais foram eutanasiados e separados as hemi-arcadas para processamento e análise histológicas. Os resultados demonstraram que é confiável a utilização da técnica de indução da doença por meio de ligadura com objetivo de pesquisar os efeitos no periodonto.

Keles et al. (2005) observaram alterações sistêmicas e periodontais em uma pesquisa experimental com latirismo, realizada com ratos, com a finalidade de comparar essas mudanças com outras encontradas em animais com periodontite induzida. A amostra foi composta por 45 animais machos, com peso médio de 200g,

os quais foram divididos em três grupos: 1- com latirismo induzido; 2- com periodontite induzida por ligadura; 3- controle. O primeiro grupo recebeu doses diárias subcutâneas de beta-aminopropionitrile; o segundo teve a periodontite induzida por ligaduras colocadas na cervical, na região dos molares mandibulares; o terceiro não recebeu nenhum tratamento. Os animais foram eutanasiados após quarenta dias, foram colhidas amostras de sangue e feitas tomadas radiográficas. Os resultados obtidos foram os seguintes: nos grupos 1 e 2, a reabsorção óssea foi observada radiograficamente em torno dos molares mandibulares; não houve reabsorção no grupo controle. O número de células inflamatórias nos tecidos conectivos e epiteliais dos grupos 1 e 2 foi muito significativa em relação ao controle; não houve diferenças significativas desses resultados entre os grupos 1 e 2. A conclusão foi de que os resultados entre os grupos do latirismo e os da periodontite induzida foram semelhantes, quanto à reabsorção óssea e ao processo inflamatório das células.

Galvão et al. (2003), em seus estudos, compararam as características histológicas da doença periodontal induzida com uso de ligaduras em ratos, associado com ou sem dieta rica em sacarose. O experimento ocorreu dentro trinta dias e divididos em quatro grupos, Grupo I ou controle (dieta padrão), Grupo II ou ligadura (dieta padrão), Grupo III ou sem ligadura com dieta em sacarose e Grupo IV ou ligadura com dieta em sacarose. Os resultados demonstraram que os grupos II e IV apresentaram com quadro de periodontite crônica, enquanto os grupos I e III não apresentaram sinais de destruição periodontal. O uso de ligaduras foi capaz de promover processo inflamatório crônico nos ratos, independentemente do tipo de dieta.

Fernandes et al. (2007) realizaram uma análise comparativa da altura óssea histométrica e morfométrica na periodontite induzida por ligadura em dez ratos com sessenta dias de vida. Na análise histológica, o estudo foi feito por meio de medidas microscópicas; a análise morfométrica foi realizada por meio de fotografias padronizadas. Os animais receberam ligaduras no segundo molar superior esquerdo por um período de trinta dias. Hemimaxilas direitas e esquerdas de cinco ratos, cortadas no sentido vestibulo-lingual e coradas, sofreram processamento para a análise histológica; hemomaxilas dos outros cinco ratos tiveram a matéria orgânica removida para a análise morfométrica. Medidas histométricas da junção vestibulo-lingual à crista óssea foram realizadas; fotografias padronizadas foram feitas para a morfometria. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os dois métodos utilizados.

Em ratos, a periodontite pode ser induzida por métodos como uma dieta rica em sacarose, inoculação experimental de microorganismos periodontopatogênicos ou indução por fio de algodão posicionado na margem gengival (indução por ligadura) Esse modelo provoca respostas à agressão mecânica, com deslocamento dos tecidos gengivais mesial e distal e redução da integridade tecidual devido à ulceração provocada pelo epitélio sulcular. O acúmulo gradual de biofilme possibilita a migração de bactérias para tecidos mais profundos, desenvolvendo um processo inflamatório periodontal, caracterizado por inflamação aguda, perda de tecido conjuntivo e instalação da doença periodontal. Uma avaliação histológica pode determinar, em ratos, alterações ósseas periodontais. Por isso, a periodontite induzida por ligadura é o meio mais indicado para investigações de curto prazo; a resposta inflamatória é mais significativa nos primeiros 15 dias, diminuindo depois

gradativamente. Porém, geralmente há um processo inflamatório e gradativa perda óssea gradativa até sessenta dias da indução (Shen et al., 2001)

Souza et al. (2009) avaliaram, morfometricamente, a influência do álcool no nível do osso alveolar associado à periodontite induzida por ligadura em 36 ratas, com 120 dias de idade. Os ratos foram randomicamente divididos em três grupos de 12, que receberam diariamente dieta de água (grupo controle), dieta de 10% de álcool etanol e dieta de 20% de álcool etanol. Quatro semanas depois, ligaduras de algodão foram colocadas na cervical, abaixo do segundo molar direito em seis ratos de cada grupo. Os outros seis (de cada grupo) permaneceram sem ligadura. Os ratos foram eutanasiados quatro semanas após a colocação da ligadura. O osso dos maxilares foi removido e a perda do osso alveolar foi analisada por meio da mensuração da distância entre cimento/esmalte juncional e a crista do osso alveolar em dois sítios bucais e dois palatais. A verificação entre ligadura e não-ligadura entre os grupos mostrou que a presença da ligadura induzida na perda óssea foi de $P < 0.05$; os grupos da não-ligadura mostraram diferenças não significativas entre cada grupo ($P > 0.05$). Nos grupos com ligadura, os animais que receberam 20% de etanol mostraram uma perda óssea significativamente maior, comparativamente aos do grupo controle e os do grupo que receberam 10%. A conclusão foi de que o álcool pode aumentar a perda óssea em ratos fêmeas.

2.3 CICLOSPORINA “A” COMO FATOR DE RISCO PARA A DOENÇA PERIODONTAL

A Ciclosporina A é um medicamento imunossupressor amplamente utilizado no tratamento de indivíduos transplantados por sua ação de inibição da diferenciação

de linfócitos T. Esta inibição se dá por uma inibição da transcrição do gene de IL-2 com o receptor citoplasmático destas células (Nassar et al., 2004).

Stanford & Rees (2003) discutiram o efeito da imunossupressão adquirida e de outros fatores de risco para a progressão da doença periodontal, explicando que a imunossupressão também pode ocorrer como resultado de várias discrasias sanguíneas e de influências hormonais. Isso pode também ser associado com uma variedade de doenças sistêmicas como lupus eritematoso, a esclerose sistêmica e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), entre outras. O uso prolongado de drogas imunossupressoras (como a Ciclosporina A) para prevenir a rejeição no caso de transplantes pode causar o aumento da incidência de infecções orais, incluindo a candidíase, a herpes simples e periodontite.

O uso da Ciclosporina e de fármacos bloqueadores do canal de cálcio podem produzir crescimento da gengiva de modo independente (Seymour, 1991). A prevalência do aumento gengival causado pelo uso da Ciclosporina ou Nifedipina varia de 20% a 40% (Barclay et al., 1992).

Um dos medicamentos mais utilizados na prevenção de rejeição de órgãos em pacientes transplantados é a Ciclosporina A (CsA), um potente imunossupressor. Esse fármaco também é indicado no tratamento de doenças, como: diabetes *mellitus* tipo 1, artrite reumatóide, psoríase, malária, líquen plano erosivo, esclerose múltipla e colite ulcerativa (King et al., 1993; Ilgenli et al., 1999).

No entanto, a eficácia da CsA e seus efeitos são obscurecidos pela administração concomitante de outros agentes imunossupressivos como esteróides, aziatioprina e anticorpos antilinfócitos. Quando esse fármaco é administrado isolado, fixada uma dosagem por um longo período de tempo, e os aspectos finais,

biológicos e clínicos, são bem definidos, há uma pequena interferência da condição da doença nos efeitos colaterais da droga (Bach, 1994).

A CsA é metabolizada no fígado e dá origem a 14 produtos metabólicos, sendo 90% deles excretados pelas fezes, e o restante, pelos rins. Entre os efeitos adversos observados no uso da Ciclosporina encontram-se: aumento gengival, nefro-toxicidade, disfunções hepáticas, distúrbios neurológicos e hipertensão (Seymour & Jacobs, 1992; Seymour et al., 2000).

O aumento do volume gengival é um dos efeitos da CsA mais relatados na literatura, podendo afetar a cavidade bucal. Porém, ele é mais observado na região vestibular dos dentes anteriores, superiores e inferiores (Seymour et al., 1996). O aumento da gengiva prejudica a higiene do paciente e altera sua estética (Chabria et al., 2003), além do odor fétido e outros (King et al., 1993).

A extensão do aumento da gengiva pode ser associada a fatores como a duração do uso da CsA, o nível de higiene bucal do paciente, o nível de gravidade da inflamação gengival, a susceptibilidade genética à droga, entre outros (Thomason et al., 1996).

A administração da CsA foi associada à significância da perda óssea e à redução de sua remodelação. A droga pode interferir na homeostase do osso alveolar em ratos. Mas na presença de uma estimulação inflamatória, a inibição do sistema imune pela CsA pode diminuir o desarranjo periodontal inicial (Nassar et al., 2004).

A CsA, apesar de amplamente usada como agente imunossupressor, causa osteoporose como efeito colateral. Resultados de pesquisas realizadas com ratos que usaram esse fármaco foi o aumento expressivo mRNA, para obter estímulos de osteocalcina, osteopontina e catepsina. Esses dados demonstraram que a

reabsorção óssea pode ser causada por uma grande mudança no nível de osteoporose e que a atividade de remodelação pode ser ativada pelo plasma do hormônio paratiroide (Wada et al., 2006).

O agente imunossupressivo da CsA é associado a um número maior de efeitos, incluindo o crescimento da gengiva. Embora a patogênese do crescimento induzido da gengiva deixe vestígios, é possível que o balanço do equilíbrio entre a síntese extracelular e a degradação resulte do excesso acumulado de componentes do tecido conjuntivo dentro do tecido gengival. Um estudo investigando o efeito da CsA sobre os tecidos da matriz de metaloproteínas, a proteína e os níveis de atividade da enzima indicou que a CsA inibiu a expressão da metaloproteinase. Os efeitos sobre os tecidos de metaloproteínas foram pouco claros (Hyland et al., 2003).

Romito et al. (2003) identificaram microorganismos superinfectantes (*Candida* e bastonetes gram-negativos) em pacientes transplantados cardíacos, relacionando-os com a presença do crescimento gengival. A pesquisa foi feita com trinta pacientes de ambos gêneros, com idade média de 45 anos. Os pacientes fizeram uso da CsA, mas não foram submetidos a nenhuma terapia à base de antibiótico, nem a tratamento periodontal prévio, no prazo dos três meses que antecederam a pesquisa. O requisito era que cada paciente tivesse, no mínimo, seis dentes. Entre os pacientes, foram registrados os: índices de placa bacteriana, índice gengival, profundidade gengival à sondagem e nível clínico de inserção. Foram formados dois grupos, com e sem crescimento gengival. A análise estatística dos resultados demonstrou que não houve diferença entre os dois grupos de pacientes, quanto ao sexo, à dosagem da CsA, ao tempo decorrido pós-transplante. A presença de *Candida* na saliva foi associada ao crescimento gengival.

Thomason et al. (2005) investigaram o efeito dos potenciais fatores de risco na severidade do desenvolvimento gengival em pacientes transplantados, medicados com CsA na ausência de algum bloqueador de canal de cálcio. Uma amostra de cem pacientes dentados, medicados com CsA, e seus dados demográficos, farmacológicos e periodontais foram obtidos por meio de anamnese. A análise univariada identificou o tempo decorrido do transplante, o índice de sangramento gengival, a concentração da creatinina, de azatioprina e dosagem de prednisolone como fatores de risco para a severidade do crescimento gengival. As dosagens de CsA, de azatioprina, do prednisolone foram obtidas com a utilização de um modelo multivariado, excluindo-se os parâmetros periodontais. A conclusão foi de que a dosagem de cada um dos três imunossupressores foi identificada como fator de risco para as mudanças referentes às condições gengivais.

Yamada et al. (2000) estudaram o efeito da CsA no crescimento gengival, partindo da hipótese de que ele poderia ser uma consequência da reduzida habilidade da degradação matricial ao invés da proliferação de fibroblastos induzida por essa droga. No experimento, foram coletados fibroblastos de gengivas humanas, foram feitas as culturas com e sem CsA (20µg/ml de fenitoína ou 200ng/ml de CsA). Foram coletadas diariamente RNA e proteínas celulares para análise de células *Reverse Transcription / Polymerase Chain Reaction* (RT/PCR) e medida da atividade lisosomal da enzima. Em complemento, foi feito um estudo imunohistoquímico para detectar as enzimas lisosomais nas células da gengiva aumentada dos pacientes que tiveram o crescimento gengival induzido pela fenitoína. Os resultados revelaram que essas drogas suprimiram a expressão de enzimas da Matriz Metaloproteinase-1 (MMP), da TIMP-1 e da catepsina L nos fibroblastos das gengivas tratadas com CsA e com fenitoína, mas não da catepsina B. Então, mediu-se a atividade das enzimas

lisosomais e das catepsinas B e L. Os resultados indicaram que embora a atividade da catepsina B não tenha sido observada na redução dos efeitos das drogas utilizadas, no total das catepsinas (B e L), houve supressão no tempo correspondente.

A CsA aumenta a remodelação óssea resultando em perda óssea, porque a reabsorção excede a formação. Os mecanismos que envolvem a perda óssea no uso da CsA são complexos, dependendo de várias citocinas celulares e matriciais, especialmente aquelas produzidas pelos osteoblastos e osteoclastos. Uma avaliação dos efeitos da CsA sobre o osso, realizada por meio de medidas da densidade mineral óssea e da análise bioquímica em sessenta camundongos, três grupos que receberam CsA (50mg/kg) e um de controle. A concentração dos marcadores séricos ósseos variou conforme o tempo de administração da CsA (sete, 14, 28 e sessenta dias). Amostras sanguíneas indicaram que houve diminuição de cálcio após 28 dias e de fósforo após sete dias. A densidade mineral óssea foi analisada por meio do software Photoshop 7,0, e o resultado demonstrou que a densidade da epífise distal dos fêmures reduziu bastante a partir de 14 dias, nos camundongos submetidos à aplicação da CsA. A conclusão foi de que a CsA induziu a perda óssea (Neves, 2006).

2.3.1 Pesquisas com Ciclosporina em animais

A CsA é um importante imunossupressor que induz o aumento da formação óssea com o excesso de reabsorção e conseqüente osteopenia. Os resultados observados em ratos foram confirmados em humanos. O fator de crescimento

transformante- β (TGF- β) é considerado importante na formação e na reabsorção, sendo estimulada por osteoblastos in vivo e in vitro e apresenta também inibição de osteoclastos in vitro. A CsA estimula a secreção do fator de crescimento transformante- β (TGF- β) em humanos, sendo que enquanto ele aumenta a imunossupressão, contribui para a toxicidade renal (Goodman et al., 2001).

Ratos tratados com 10mg/kg de CsA diariamente, durante sessenta dias, demonstraram crescimento gengival, com aumento na espessura do epitélio, da altura, da largura do tecido conjuntivo e da densidade dos fibroblastos e das fibras colágenas. Cinco dias após a interrupção do tratamento, que durou noventa dias, foi observado que o uso da CsA foi interrompido, sendo observado uma redução progressiva do volume da gengiva, da densidade das fibras colágenas e da densidade dos fibroblastos. Porém, apesar disso, o tecido não voltou a apresentar suas características de normalidade (Spolidorio et al., 2001).

Diferentes concentrações de CsA, 10mg/Kg, 25mg/Kg e 40mg/Kg, cinco vezes por semana, administradas via peritonial, foram usadas em um estudo com camundongos, em um estudo semelhante aos realizados com humanos. Os animais foram divididos em três grupos de linhagens diferentes, e as alterações anatômicas e histológicas verificadas no período de estudo foram documentadas em intervalos distintos. Os animais manifestaram hiperplasia gengival após oito semanas de uso da CsA, sendo a dose dependente do medicamento considerada conforme o aparecimento das primeiras manifestações. Os animais apresentaram eritema em seis semanas, independentemente da dosagem aplicada. O exame histológico demonstrou aumento na vascularização, na espessura no tecido epitelial e conjuntivo, edema e infiltrado mononuclear. A conclusão foi de que é possível

desenvolver em outras espécies o crescimento gengival induzido pela CsA, com características semelhantes em humanos (Meller et al., 2002).

O efeito da CsA no osso alveolar de ratos com periodontite experimental foi estudado por meio de análises radiográfica, estereométrica e do soro. Um grupo de 24 ratos foi dividido em quatro subgrupos, classificados em: 1- controle; 2- ratos com ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior; 3- ratos com ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior, tratados com 10mg/Kg de CsA; 4- ratos tratados com 10mg/Kg de CsA. Após o período experimental de trinta dias, os animais foram mortos, e foram feitas avaliações dos níveis de cálcio e fosfatase; a distância da crista do osso alveolar a junção cimento-esmalte foi avaliada por meio de radiografia de cada superfície mesial dos primeiros molares inferiores de cada um dos ratos. Depois da avaliação histológica, obteve-se o volume de osteoclastos, de osso alveolar, da medula e a relação da superfície óssea saudável/erosão da região mesial do osso alveolar. Ao final, os resultados demonstraram: um decréscimo significativo do nível de cálcio no soro em todos os animais que receberam CsA; em nenhum foi verificada mudança significativa no nível de fosfatase alcalina no soro; diminuição do osso alveolar, aumento no volume de osteoclasto, diminuição da medula e da relação da superfície óssea saudável/erosão, na superfície mesial do primeiro molar inferior nos animais que receberam ligadura e foram tratados com CsA no grupo 3. Já os resultados da radiografia mostraram que o uso exclusivo da CsA reduziu a perda óssea alveolar na superfície mesial dos primeiros molares inferiores (Nassar et al., 2004).

Os efeitos do uso prolongado da CsA no osso alveolar e no tecido gengival foram avaliados em ratos. Os animais foram divididos em grupos e tratados com injeções diárias subcutâneas de 10mg/Kg de CsA, aplicadas com sessenta, 120, 180

e 240 dias. Após o experimento, os animais foram eutanasiados, sendo feita a análise dos níveis de fosfatase alcalina e de cálcio no soro. Depois da histologia, fez-se uma avaliação do epitélio oral, do tecido conjuntivo, do volume do osso alveolar e dos osteoclastos na região de primeiro molar inferior, constatando-se o seguinte: os grupos que receberam CsA demonstraram aumento nos níveis de fosfatase alcalina no soro, com significativo aumento no volume do epitélio e do tecido conjuntivo, após a utilização do medicamento no período entre sessenta e 120 dias; verificou-se uma redução no volume do tecido ósseo e aumento no número de osteoclastos. Após 180 e 240 dias de tratamento, observou-se redução no crescimento gengival, com redução do epitélio e do tecido conjuntivo. Também se verificou aumento no volume do tecido ósseo e redução do número de osteoclastos. A conclusão foi de que as modificações no periodonto associadas à utilização da CsA apresentam uma relação estreita com o tempo de uso do medicamento (Spolidorio et al., 2004).

Sakakura et al. (2006) afirmaram que agentes imunossupressivos podem induzir severas mudanças no metabolismo ósseo e podem prejudicar o processo de osseointegração durante a cicatrização do implante. Não há dados disponíveis referentes à influência da CsA em implantes dentários previamente osseointegrados. Os autores avaliaram a influência da administração da CsA na retenção mecânica do osso previamente integrado ao implante dentário. Dezoito coelhos fêmeas foram submetidos a uma cirurgia de implante, recebendo, cada animal, um implante de 10 X 3.75mm, disponível comercialmente. Após 12 semanas do período de cicatrização, seis animais foram eutanasiados randomicamente, sendo removido o material para o teste (Grupo A). Seis animais foram submetidos a injeções diárias de CsA, em dosagem de 10mg/kg (Grupo C), e seis receberam solução salinizada como controle

(Grupo B). Após 12 semanas de administração da CsA, os grupos A e C foram eutanasiados e submetidos ao teste de torque, sendo que os maiores valores podem ser interpretados como mecanismos de retenção óssea da superfície do implante ou uma osseointegração maior. Os resultados do torque foram: 30.5 (\pm 9.8), grupo A; 50.17 (\pm 17.5), grupo B; 26 (\pm 7.8), grupo C. A análise estatística mostrou diferenças significantes entre os grupos B e C e entre os grupos A e C. A conclusão foi que a administração da CsA pode impedir o mecanismo de retenção de implantes dentários previamente integrados ao osso.

Asahara et al. (2000) utilizaram um estudo para determinar a função dos mastócitos envolvidos no desenvolvimento da hiperplasia gengival induzida, com uso da CsA. Foi observado um aumento no número de mastócitos deficientes em partes dos tecidos da gengiva inflamada. O estudo foi realizado com trinta camundongos com três semanas de idade, machos e fêmeas, que tinham os mastócitos deficientes. O protocolo para a indução da hiperplasia por meio da CsA foi basicamente o mesmo utilizado no estudo prévio, exceto no que se refere à quantidade de CsA, pois o estudo anterior a pesquisa foi realizada com ratos. Como o metabolismo dos camundongos é mais rápido do que o dos ratos, foram usados 1.5, duas, 2.5 e três vezes mais CsA. Os camundongos foram divididos em cinco grupos de seis (três machos e três fêmeas), sendo utilizados 0, 300, 400, 500 e 600mg de CsA; eles foram mantidos em uma sala devidamente higienizada e após trinta dias, foram eutanasiados, avaliando-se o grau da hiperplasia gengival. O material recolhido foi embebido em parafina e dividido em seções e corados com azul de toluidina (pH 3.0). A presença ou a ausência de mastócitos foi determinada microscopicamente, e os resultados demonstraram o seguinte: nos grupos nos quais se utilizou 300, 400 e 500mg de CsA não se observou nenhuma hiperplasia gengival

aparente, sugerindo que a quantidade de CsA não foi suficiente para manter a concentração que induziria à hiperplasia. Já com o grupo no qual se usou 600mg de CsA, foram verificados sinais de hiperplasia gengival.

Gonçalves et al. (2003) afirmaram que o uso de agentes imunossupressores é reconhecido como um fator que afeta os tecidos moles do periodonto, embora pouco se saiba sobre seus efeitos na progressão da periodontite. Eles investigaram a influência da CsA, em conjunto ou não com a nifedipina, na perda óssea causada pela periodontite induzida por ligaduras. O estudo foi realizado com 24 ratos machos adultos, nos quais foram colocadas ligaduras de fio de algodão em torno do primeiro molar inferior direito ou esquerdo, deixando sem ligadura o dente correspondente do lado oposto. Os animais foram divididos em: grupo A, solução salina; grupo B, CsA; grupo C, nifedipina; grupo D, CsA e nifedipina. Após 45 dias, os animais foram eutanasiados para a análise histométrica. Os resultados revelaram o seguinte: não houve diferenças significativas em relação à perda óssea entre os tipos de tratamento; a análise intragrupo mostrou um maior volume de perda óssea nos dentes com ligadura em relação aos sem ligadura. Os autores concluíram que a administração da CsA, com ou sem nifedipina, não influenciou a perda do osso alveolar na periodontite induzida por ligaduras em ratos.

Centinkaya et al. (2006) investigaram a relação entre o antígeno nuclear das células em proliferação (PCNA) e suas alterações histomorfológicas em ratos, com o uso da CsA no crescimento gengival induzido ou sem acúmulo de placas dentárias microbianas. A amostra foi composta por quarenta animais divididos em quatro grupos: grupo I- controle; grupo II- que usou a CsA; grupo III- com a ligadura; grupo IV- com ligadura e CsA. Após cinco semanas de período experimental, os animais foram decapitados e os molares mandibulares foram dissecados. O crescimento da

gengiva foi determinado pela medida de profundidade do sulco gengival, as mandíbulas foram descalcificadas e foram obtidas seções seriais de análise histomorfométrica (incluindo medidas da doença epitelial) e imunohistoquímica (incluindo avaliação da PCNA). Os resultados mostraram que a doença epitelial e a PCNA foram significativamente aumentados nos grupos II ($p < 0.05$) e IV ($p < 0.05$) comparativamente ao grupo controle; o crescimento gengival foi mais proeminente no grupo IV que no grupo II. Esses resultados indicam que a CsA induziu alterações gengivais associadas ao aumento da atividade proliferativa epitelial; a da placa dentária parece não ter sido essencial, mas pode ser considerada um agravante fator de progressão das lesões. A conclusão foi de que as alterações epiteliais no crescimento induzido da gengiva são diretamente associadas ao aumento da atividade proliferativa e PCNA e podem ser usadas como índice de proliferação celular no crescimento induzido da gengiva.

Fu et al. (2001) estudaram, microscopicamente, em animais, o efeito da CsA sobre o osso trabecular do côndilo. A amostra foi constituída de vinte ratos machos com cinco semanas de vida, que foram divididos em dois grupos: um de tratamento e o controle. Os animais do grupo de tratamento receberam a CsA, 15mg/kg segundo o peso corporal, por uma sonda gástrica; o grupo controle recebeu somente uma substância sem efeito terapêutico. Cinco animais de cada grupo foram mortos ao fim da segunda e da quarta semanas. Após o processo histológico, dez seções de tecido da parte média do côndilo mandibular foram examinadas e a osteopenia foi observada ao redor do côndilo após o tratamento com a CsA, especialmente no final da quarta semana. No grupo controle, o volume do osso trabecular foi substancialmente aumentado entre a segunda e a quarta semanas, passando de 0.46 ± 0.07 a $0.61 \pm 0.07 \text{mm}^3/\text{mm}^3$. Entretanto, houve uma perda

significativa do osso alveolar no grupo da CsA em relação ao grupo controle no mesmo período (0.33 ± 0.02 versus 0.46 ± 0.07 ; 0.26 ± 0.07 versus $0.61 \pm 0.07 \text{mm}^3/\text{mm}^3$, respectivamente). Foram observados decréscimos trabecular, no volume osteóide e cortical da área óssea. Concluiu-se que a CsA diminuiu significativamente uma área específica da superfície do osso trabecular.

A perda óssea é considerada um efeito colateral significante da CsA, porque pode resultar em séria morbidade para os pacientes. A CsA também pode afetar o osso alveolar. Para avaliar a perda óssea, um estudo feito com quatro grupos de ratos aos quais foram administrados, concomitantemente: CsA, alendronato, ambas as drogas e um grupo controle. A depender do grupo, cada animal recebeu doses diárias de 10mg/kg de CsA, semanais de 0.3mg/kg de alendronato e de ambos os fármacos, durante sessenta dias; o grupo controle recebeu injeções de solução salina. Foram coletados dados sobre os níveis de cálcio, de fosfatase, do volume ósseo, da superfície alveolar e o número de osteoblastos por superfície óssea. Os resultados foram os seguintes: no grupo da CsA, verificou-se uma diminuição não significativa do volume do osso alveolar; nos grupos com alendronato ou CsA e só alendronato também não se observou mudança significativa nos níveis ósseos; no grupo controle a média do osteocálcio foi de $66.9/0.3/\text{ng/mL}$. A conclusão foi de que a administração concomitante do alendronato com a CsA pode ter reduzido os efeitos dessa nos animais investigados (Spolidorio et al., 2007).

Fu et al. (1999) pesquisaram, em ratos, os efeitos da CsA sobre o osso alveolar, por meio de avaliações histológica e histométrica. Uma amostra de sessenta ratos com seis semanas de idade foram separados em dois grupos, de teste (I) e controle (II). Os animais de teste receberam a CsA em óleo mineral (30mg/kg) diariamente, por meio de fendas gástricas; o grupo controle recebeu

somente óleo mineral. Dez animais de cada grupo foram eutanasiados na segunda, quarta e sexta semanas e após o processo histológico, a cresta labial do osso alveolar da mandíbula anterior foi avaliada microscopicamente. Os resultados apontaram um aumento de osteoclasia e redução da formação óssea no grupo de teste, em relação ao grupo controle. O aumento da osteoclastia foi observado em sítios e a diminuição da formação óssea foi observada em sítios sinfiseais. A conclusão dos autores foi de que os resultados sugerem que a CsA tem efeitos distintos sobre o osso alveolar.

Shen et al. (2001), com base em resultados de osteopenia induzida por CsA ao redor de alvéolos dentários incisivos mandibulares em ratos, analisaram histomorfologicamente segundos molares tratados com CsA e elucidaram os seguintes efeitos em vinte animais da amostra: a massa óssea total dos alvéolos dentários diminuiu mais no grupo da CsA do que no grupo controle, nos mesmos intervalos observados. As medidas histométricas, exceto superfície óssea, foram significativamente afetadas pela localização do alvéolo (apical, palatal, etc.) e pela terapia com CsA. O volume ósseo diminuiu, mas aumentou o volume do espaço medular no grupo da CsA, quando comparado ao grupo controle. Embora a superfície do osso alveolar não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos, um maior volume foi observado no grupo da CsA. A conclusão foi de que CsA age de forma inibitória nos alvéolos dentários.

Centikaya et al. (2006) investigaram os efeitos da CsA no osso alveolar em ratos machos submetidos ou não a doença periodontal experimental, usando análises bioquímicas, radiográficas e histométricas. Os quarenta animais foram divididos em quatro grupos: I- de controle; II- CsA subcutânea em doses diárias de 10mg/kg; III- com ligadura colocada em molares mandibulares; IV- com ligadura e

CsA. Após sessenta dias, os animais foram decapitados, sendo medidos os níveis de fosfatase e de cálcio. Foram determinados os percentuais de nova formação óssea e feitas medidas histométricas e radiográficas da perda óssea. Os resultados apontaram o seguinte: um significativo aumento da fosfatase e não significativa diferença no nível de cálcio no grupo IV, quando comparado ao grupo III; a perda óssea foi significativamente maior no grupo IV do que no grupo III; não houve diferenças significativas nos parâmetros dos grupos II e I. Concluiu-se que o tratamento da doença periodontal com CsA, em ratos, pode trazer desequilíbrio à homeostase do osso alveolar, diminuindo a reabsorção e estimulando a formação de osso alveolar.

2.4 OSTEOCLASTO E A BIOLOGIA ÓSSEA

Downey & Siegel (2006) afirmaram que a biologia óssea é um vasto e complexo campo de desenvolvimento de estudos, que trazem em conjunto aspectos tradicionais de anatomia, de psicologia e de biomecânica, além dos complexos campos da biologia e a genética molecular. O osso é composto de quatro elementos celulares: osteoblastos, osteócitos, células ósseas de revestimento e osteoclastos. Os três primeiros se originam do tronco mesenquimal conhecido como células osteoprogenitoras; os osteoclastos têm origem no tronco celular hemopoético. As células encontradas ao longo da superfície de um osso incluem osteoblastos, células ósseas revestidas e osteoclastos; os osteócitos são encontrados no interior do osso.

Roodman (1999) afirmou que os eventos que ocorrem durante a diferenciação da reabsorção óssea no osteoclasto e no osteoblasto são difíceis porque os

osteoclastos são em pouco número, frágeis quando isolados do osso e difíceis de isolar, porque eles são embebidos em uma matriz calcificada. Até pouco tempo, nenhuma linha de células osteoclasto havia sido avaliada. Buscando resolver esse problema, vários modelos foram desenvolvidos para identificar os osteoclastos precursores, para caracterizar o fenótipo de sua superfície e os fatores que afetam sua atividade e formação.

Ramalho et al. (2000), em uma revisão da literatura, avaliaram a melhora da densidade mineral óssea proporcionada pela ação do estrógeno e de um modulador seletivo receptor do estrógeno. Com a revisão os autores responderam as perguntas que se seguem: a) qual a célula-alvo de ação do estrógeno no osso? O receptor do estrógeno foi descrito como monócito, osteoclasto, células do estroma da medula óssea e osteoblasto, porém, seu papel no efeito do estrógeno é desconhecido; b) quais os mediadores do efeito do estrógeno no osso? Os resultados são controversos quanto ao papel da interleucina, demonstrando serem positivos no animal e negativos no homem; c) o efeito antiosteoclástico do estrógeno está relacionado com a apoptose de precursores dos osteoclastos? Em animais, o estrógeno aumenta a apoptose dos precursores dos osteoclastos, mas no homem o efeito é desconhecido; d) qual o papel do estroma na medula óssea na osteoclastogênese e em sua inibição pelo estrógeno? Um fator produzido pelo estroma, o RANK induz à formação de osteoclastos e sugere a importância dessas células na osteoclastogênese e no efeito do estrógeno no osso; e) qual a via de transcrição intracelular ao efeito do estrógeno? Proteínas NF- κ B podem ter um papel importante na osteoporose na menopausa e pode corresponder à forma pela qual o estrógeno regula a produção de citocinas na osteoclastogênese.

A osteoprotegerina (OPG), protetora do osso, um fator inibidor de osteoclastogênese, é uma proteína semelhante aos membros da família de receptor para fator de necrose tumoral (TNF). Ela funciona como um receptor solúvel para RANK, competindo com RANKL, molécula da família do TNF- α . O RANK e o RANKL são fundamentais para a remodelação óssea, regulam a interação entre os linfócitos T e células dendríticas, são essenciais para o desenvolvimento e para a ativação de osteoclastos e perda óssea em relação a todos os estímulos conhecidos (Golmia & Scheinberg, 2004).

O receptor ativador nuclear do fator-kapa B Ligand (RANKL) é uma proteína e é o principal fator na regulação dos osteoclastos. O RANKL, também conhecido como TNF-Related, citocina de ativação induzida (TRANCE), Osteoprotegerina Ligante (OPGL) e fator ativador de osteoclasto (ODF) é uma importante molécula do metabolismo ósseo. A superfície natural e necessária dessa molécula ativa osteoclastos, células envolvidas na inibição da reabsorção óssea. A superprodução de RANKL implica uma variedade de doenças ósseas degenerativas, como artrite reumatóide, entre outras. RANKL é também uma função do sistema imune, expressada pelas células auxiliares T e envolvido na maturação das células dendríticas. Essa proteína foi mostrada como fator de sobrevivência das células dendríticas, envolvida na regulação da resposta imune mediada por células T. A ativação das células T induz a expressão do gene do RANKL, levando ao aumento de osteoclastogênese e perda óssea (Kawai et al., 2006).

O RANKL, um fator crítico de diferenciação do osteoclasto, é expresso pelo linfócito T na doença periodontal humana e pode ser estudado por meio de análises imunohistoquímicas. A administração sistêmica da osteoprotegerina, receptor atrativo e inibidor do RANKL, resulta na reabsorção óssea na doença periodontal.

Um estudo com ratos indicou que a célula T, mediada pela reabsorção óssea, é dependente do RANKL. Tratamentos feitos com kalitoxina demonstraram uma diminuição na expressão da célula T no RANKL, diminuindo a indução da dependência do RANKL da osteogênese e anulando a reabsorção óssea, representando uma importante regra da resposta imune (Taubman et al., 2005).

Como a doença periodontal continua aumentando seus níveis, mesmo com as células B produzindo armas de combate à bactéria, surge uma questão importante: o RANKL expressado nas células B e T dos tecidos gengivais é muito potente e pode estimular as células destrutivas ósseas, os osteoclastos. A expressão do RANKL por células T e B demonstra que ele é um dos principais estímulos de células precursoras de osteoclastos e, em consequência, da perda óssea com a doença periodontal. Não há relatos de que alguma bactéria por si só invada e reabsorva ossos, sem uma ativação dos osteoclastos. O RANKL é uma importante molécula do metabolismo ósseo; sua superfície natural ativa os osteoclastos, que são células envolvidas na reabsorção óssea. A excessiva produção do RANKL provoca doenças ósseas degenerativas, como a artrite reumatóide. O RANKL também está envolvido com a função do sistema imune, a qual é expressa por células T auxiliares (Kawai et al., 2006).

Han et al. (2007) demonstraram a relação entre a perda óssea alveolar e os linfócitos T e B, por meio da síntese e liberação do RANKL, já tendo comprovado em outros estudos a relação entre a quantidade de RANKL e a gravidade da perda óssea em vários níveis de gravidade da doença periodontal. Antes da identificação do RANKL, entendia-se que só os osteoblastos e as células precursoras ósseas eram associados à diferenciação dos osteoclastos, ignorando-se a presença de algum fator imunomediado nesse processo.

O metabolismo do tecido duro é influenciado pelo sistema imune. Pesquisas sobre destruição óssea associada a doenças inflamatórias, como a periodontite e a artrite reumatóide, têm salientado a importância da influência recíproca entre a imunidade e o sistema esquelético. Esse campo de pesquisa cuida da regulação da célula T da osteoclastogênese pelo RANKL e pelo Interferon. Sugere-se que os sistemas imune e esquelético participam com citocinas e com várias moléculas, com os fatores e com a membrana receptora (Takayanagi, 2005).

Os osteoclastos, células gigantes multinucleares que reabsorvem o osso, se desenvolvem a partir de células hematopoéticas de linhagem monócito-macrófago. Os osteoblastos, ou células ósseas da medula, são envolvidos na osteoclastogênese através de um mecanismo que engloba o contato célula a célula com as células osteoclásticas progenitoras. A descoberta da osteoprotegerina e do RANKL tornou possível a hipótese de que células osteoblásticas expressem fatores de diferenciação (ODF), em resposta aos fatores osteotrópicos e à diferenciação osteoclástica de seus precursores (Kobayashi et al., 2000).

A descoberta do RANKL e a decodificação de seu receptor, a osteoprotegerina, confirmaram a idéia de que a diferenciação e a função dos osteoclastos são reguladas pelos osteoblastos. O recrutamento de novos osteoclastos depende do balanço entre o RANKL e a osteoprotegerina. Esta relação pode ser observada em estudo no qual ratos exibiram uma severa osteopetrose e uma reduzida atividade osteoclástica, como resultado da inabilidade de seus osteoblastos em suportar a osteoclastogênese (Nagasawa et al., 2007).

A prevenção da destruição do osso alveolar é um desafio clínico no tratamento da doença periodontal. Para estudar os efeitos inibitórios do RANKL na perda do osso alveolar foi usado um modelo experimental de periodontite induzida por

ligadura em ratos. Foram utilizados 32 animais, divididos em dois grupos segundo a administração de osteoprotegerina humana via subcutânea, duas vezes por semana por seis semanas e, subdivididos em outros dois grupos segundo seus prazos de sacrifício após três ou seis semanas. As mandíbulas foram avaliadas por tomografia computadorizada e exame histológico. Os níveis de osteoprotegerina humana no soro e da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foram mensurados através de ELISA. Os resultados demonstraram que a osteoprotegerina humana foi detectada no soro dos animais tratados e a fosfatase ácida resistente ao tartarato esteve reduzida durante o período da observação. Verificou-se a preservação de um volume significativo do osso alveolar entre os animais tratados, comparados com os do grupo controle entre a terceira e a sexta semanas. A histologia descritiva demonstrou redução significativa no número de osteoclastos da superfície na crista óssea alveolar. A conclusão foi que o uso sistêmico da osteoprotegerina humana inibe a reabsorção óssea na periodontite experimental, sugerindo que a inibição do RANKL pode representar uma estratégia terapêutica importante para a prevenção da perda progressiva do osso alveolar (Qiming et al. 2007).

O RANKL e a osteoprotegerina são fatores críticos para o controle homeostático da atividade osteoclástica, sugerindo suas funções vitais na progressão da perda óssea na periodontite. A expressão do RANKL e a osteoprotegerina, RNA e a relação entre esses fatores e a bactéria periodontopatológica no tecido periodontal foram estudadas por meio de amostras do tecido gengival e da placa subgengival coletadas em 15 pacientes com periodontite crônica e 15 pacientes com saúde periodontal. O RNA foi extraído do tecido e submetido à reação da cadeia de polimerase-transcriptase reversa, usada especificamente para o RANKL ou para a osteoprotegerina. Os números de

Porphyromonas gingivalis e do *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foram determinados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR). Os resultados mostraram um aumento do nível de RANKL nos tecidos da periodontite crônica. A expressão do RANKL e da osteoprotegerina foram significativamente mais altos na periodontite do grupo estudado do que no grupo controle com periodonto saudável ($p=0.001$). Um dado interessante foi que a expressão do RANKL ($r=0.64$; $p<0.001$), mas não da osteoprotegerina ($r=0.24$; $p=0.20$) foi significativamente correlacionada com o número de *P.gingivalis*. A *Actinomycetemcomitans* foi detectada somente em 6,7% de todos os sítios. As conclusões foram de que a periodontite crônica foi associada ao aumento na expressão mRNA RANKL (Wara-aswapati et al., 2007)

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo localizado entre o osso alveolar e a superfície da raiz do dente. Células desse ligamento se caracterizam pelos cementoblastos e são capazes de diferenciar osteoblastos de cimentoblastos. Elas têm o importante papel de manter a integridade dos tecidos periodontais. Desde a descoberta do RANKL e seu decodificador/receptor osteoprotegerina, acreditava-se que o balanço desses dois fatores é crítico para regular a diferenciação e a função dos osteoclastos; o RANKL se expressa por meio de membranas celulares nos osteoblastos. Outros fatores como os estrógenos podem afetar a expressão da osteoprotegerina e do RANKL no ligamento periodontal. Na pesquisa, foi utilizada a técnica interferente do RNA para inibir o receptor estrógeno beta ($Er\beta$) expressão das células do ligamento periodontal em humanos. As células foram submetidas a uma cultura com concentração saturada de 17β -estradiol por 48 horas. As mudanças na expressão da osteoprotegerina e RANKL foram determinadas pela reação em cadeia da polimerase após a transcrição reversa e

suportada pela análise de Western blot. Os resultados demonstraram que o estradiol causou o aumento da expressão da osteoprotegerina e redução do RANKL, expressão das células do ligamento periodontal em humanos. A conclusão foi de que o estrógeno pode ter uma importante função na diminuição da reabsorção do osso alveolar, pelo menos em parte, pelo aumento da expressão do nível da osteoprotegerina em relação à expressão de RANKL (Liang et al., 2008).

A reabsorção odontoclástica da raiz é um importante aspecto na relação do movimento ortodôntico, e a reabsorção de raízes na dentição primária são um fenômeno biológico intrigante. A coordenação funcional da osteoprotegerina / RANKL e sistema RANK parecem contribuir não somente para a remodelação alveolar, mas também para a reabsorção durante a movimentação ortodôntica dentária e reabsorção fisiológica da raiz. O sistema osteoprotegerina / RANKL / RANK determinam que suas concentrações possam ser usadas para prever o nível de remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica, o efeito em cadeia entre a remodelação e a reabsorção da raiz e o grau de reabsorção da raiz. Estudos imunohistoquímicos vêm mostrando que o RANKL é expresso por odontoblastos, fibroblastos da polpa e do ligamento periodontal e cementoblastos. O RANK é expresso por odontoclastos multinucleados, localizados próximo à superfície da dentina em reabsorção ou por precursores mononucleados. A osteoprotegerina é expressa por odontoblastos, ameloblastos e células dentárias pulpare. Como em osteoclastos, o RANKL também é expresso em odontoclastos, sugerindo efeitos autócrino ou parácrino na regulação dessas células. Na movimentação ortodôntica dos dentes, devido à compressão lateral, o RANKL é induzido. Ele ativa a osteoclastogênese, o que é melhor demonstrado por meio da aceleração do movimento dentário, o qual é executado após a transferência do gene do RANKL

para o tecido periodontal. Em contraste, parece que no lado de tensão do movimento ortodôntico, há um aumento da síntese da osteoprotegerina (Tyrovola et al., 2008).

RANK e RANKL, duas citocinas do tipo proteína, foram localizadas em células ósseas. Elas são cruciais para regular a diferenciação das células osteoclásticas, precursoras da formação e do desenvolvimento de vários tipos de células sanguíneas (hematopoese), e também para regular a maturação dos osteoclastos, por meio do contato célula a célula, e a subsequente sinalização de seus diversos processos intracelulares. O exame de áreas de RANK e de RANKL e de sua correspondência com células humanas dentárias de tecidos periodontais duros foi feito, com utilização de uma luz microscópica imunohistoquímica sobre partes de tecidos de dentes decíduos, nos quais houve reabsorção da raiz. Os resultados demonstraram a existência de citoplasmas granulares de imunorreatividade do RANKL, fibroblastos nos ligamentos periodontais e odontoclastos. Células RANK positivas foram identificadas como odontoclastos multinucleados, localizadas próximas à superfície da dentina na lacuna da reabsorção, ou como precursoras mononucleadas. Os achados indicam que as células dentárias humanas são chaves mediadoras da reabsorção do tecido duro e, embora o sistema RANK/RANKL não possa sozinho regular a reabsorção da raiz do dente, esses fatores podem pelo menos contribuir para esse complexo processo (Lossdorfer et al., 2002).

Spahni et al. (2009) analisaram se o sistema RANK/RANKL/OPG é ativo em cães, nos casos positivos, verificaram as diferenças entre articulações saudáveis e articulações com artrite, quanto à presença de mediadores que provocam a reabsorção óssea. A distribuição do RANK e do RANKL foi investigada em fragmentos coronóides de cães com artrite nos cotovelos, retirados por meio de uma

remoção cirúrgica, e em amostras correspondentes de cães saudáveis eutanizados por outras razões que não a doença das articulações. Na investigação, foram utilizados o método imunohistoquímico e um microscópio de alta resolução de fluorescência, para verificar a distribuição do RANK, do RANKL e da OPG. Todas as três moléculas foram identificadas pela imunocoloração do tecido ósseo canino. Na displasia do cotovelo, o número de osteoclastos RANK positivos aumentou. Em suas células, os níveis de RANKL, controlam a ativação de osteoclastos, foram abundantes, enquanto o número de osteoblastos demonstrou um potencial limitado de osteoclastogênese e reabsorção óssea por meio da OPG foi pouca. A conclusão foi de que o sistema RANK, RANKL e OPG é ativo na remodelação óssea em cães. Na displasia de cotovelo, foi evidente o aumento de moléculas na promoção da osteoclastogênese, num indicativo de que não há um balanço entre os mediadores da regulação da reabsorção e da formação óssea. Ambos, OPG e anticorpos neutralizantes contra o RANKL, têm um potencial o potencial para contrabalançar a reabsorção óssea.

Tobón-Arroyave et al. (2005) avaliaram a expressão fenotípica de vários fatores osteotrópicos de células em casos de lesões centrais de células gigantes (CGCG). Tecidos de 27 casos agressivos de CGCG e de dez casos não agressivos foram avaliados, por meio do método imunohistoquímico, para se identificar a expressão do RANK, do receptor glucorticóide X (GRx) e de receptores afins da calcitonina (hormônio da tiróide, inibidor da liberação de cálcio nos ossos) (CTR). Também foi utilizado o método da imunorreatividade em cada marcador, para se mensurar a intensidade da distribuição. Os resultados mostraram que células gigantes multinucleadas, células gigantes mononucleadas e células endoteliais foram intensamente positivas para GRx, moderadas para RANK e entre fraca e

moderada para CTR em todos os grupos clínicos. As células fusiformes foram intensamente imunorreativas para GRx e não reativas para CTR e RANK. Embora nenhuma diferença nos resultados do RANK, do GRx e do escore de intensidade de distribuição tenha sido observada entre as formas clínicas de CGCG, uma significativa diferença foi verificada em relação ao CTR. A comparação entre o marcador de expressão do RANK e o escore de intensidade mostrou uma correlação significativa para os três marcadores dentro dos grupos clínicos. A comparação entre a expressão do GRx e o escore de intensidade evidenciou uma significativa correlação entre eles no grupo clínico de casos agressivos e não significativa no grupo de casos não agressivos. A comparação entre o CTR e o escore de intensidade mostrou uma relação significativa entre eles nos dois grupos clínicos.

Kim et al. (2007) investigaram o efeito do baixo nível de laserterapia (LLLT) na cicatrização de um implante dental com titânio. A pesquisa foi realizada com ratos, sendo um grupo deles tratado com LLLT por uma semana e o outro, controle, que não recebeu tratamento. A cada um, três, sete, 14 e 21 dias do experimento, dois ratos de cada grupo eram eutanizados, investigando-se a expressão do RANL, da OPG e do RANK. Os resultados demonstraram o seguinte: o RANK foi observado no estágio inicial do implante em ambos os grupos (experimental e controle). No entanto, o grau de expressão foi mais alto no grupo experimental. A expressão de OPG aumentou marcadamente no grupo experimental, enquanto que no grupo controle aumentou só levemente. A expressão do RANK foi observada desde o primeiro dia, mas só no grupo controle ela foi discretamente verificada após o terceiro dia. A expressão geral dentro do osso foi levemente observada no sétimo dia no grupo controle, enquanto uma expressão ativa foi comprovada no grupo experimental. A densidade óssea após o implante, no período da osseointegração,

foi mais alta no grupo experimental do que no controle. Esses resultados levaram à conclusão de que a aplicação de LLLT influenciou as expressões de OPG, de RANK e de RANKL, durante a osseointegração de implante dentário de titânio, resultando na expansão do osso metabólico na atividade e aumentando a atividade das células ósseas do tecido.

Teitelbaum (2000) explicou que a reabsorção óssea é a única função do osteoclasto, o qual é considerado um macrófago especializado, cuja diferenciação é regulada principalmente pelo fator estimulador de macrófagos, pelo RANK e pela OPG. Os osteoclastos desenvolvem um citoesqueleto especializado que permite estabelecer um microambiente isolado entre eles mesmos e o osso, no qual a degradação da matriz corre mediante um processo que envolve o próton hidrogênico. Os genes mutantes osteopetróticos proporcionam informações sobre os genes que regulam a diferenciação dos osteoclastos e sua capacidade de reabsorção óssea.

Mogi et al. (2004) se reportaram a um estudo recente com animais, cujos resultados sugerem o envolvimento do RANKL na patogênese da doença periodontal. No entanto, não foi examinado o nível de RANKL no fluido do corpo de humanos. Os autores se referiram a concentrações in vivo de RANK e ao RANKL no fluido gengival crevicular de sujeitos com periodontite severa, moderada e em formas de doenças suaves. Um aumento da concentração de RANKL e uma redução da concentração da osteoprotegerina foram detectados no fluido gengival crevicular ($P < 0.05$ /grupo controle) em pacientes com periodontite. O nível de concentração do RANKL em relação à osteoprotegerina foi significativamente mais alto nos sujeitos com doença periodontal do que nos sujeitos com saúde oral

($P < 0.01$). Juntos, esses dados sugerem que o RANKL e a osteoprotegerina contribuem para a destruição óssea na doença periodontal.

Zhang & Peng (2005) avaliaram a localização imunohistoquímica do RANKL em lesões periapicais induzidas em ratos. A indução foi feita por meio da exposição da polpa e dos primeiros molares mandibulares. Os animais foram eutanasiados randomicamente nos dias zero, sete, 14, 21 e 28 após a exposição e suas mandíbulas foram removidas, desmineralizadas e embebidas em parafina. Seções frontais na região do primeiro molar foram preparadas com enzima histoquímica e imunohistoquímica. A fosfatase ácida tartarato resistente e as células RANKL positivas puderam ser observadas no sétimo dia; entre o sétimo e o 14º dias, verificou-se o aumento da infiltração inflamatória e a reabsorção do osso alveolar na região periapical. A expressão e o número positivo da fosfatase ácida tartarato e o RANKL positivo foram expressivos no 14º dia. Entre os dias 21 e 28, a expressão do RANKL diminuiu e pôde-se observar uma menor fosfatase ácida tartarato resistente. Os achados demonstraram que o RANKL observado pode ser associado à patogênese da lesão periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi comparar as características histopatológicas do tecido ósseo em ratos previamente tratados com Ciclosporina A e posteriormente expostos ou não à periodontite induzida por ligadura.

O objetivo secundário foi avaliar o evento biológico de reabsorção óssea por meio da quantificação do Receptor Ativador Nuclear Fator-Kappa B (RANK).

4 MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNITAU (CEEA/UNITAU nº 00197/06), foram utilizados com quarenta ratos do tipo *novergicus*, variação *albinus*, *Wistar*, de dez semanas de idade e peso médio de 300g. Eles foram mantidos em gaiolas com temperatura ambiente e alimentados com água e ração *ad libitum*, a qual foi fornecida pelo biotério do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté. De início, os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos de dez e mantidos em condições semelhantes: um grupo Controle (GC), de ratos sem ligadura e sem medicação; um grupo com ligadura e sem medicação (GL); um grupo Ciclosporina A (GCsA), no qual foi administrado 10mg/kg de CsA durante sessenta dias a partir do início do experimento; grupo Ciclosporina A com ligadura (GCsAL), no qual foi feita a inserção da ligadura e administração CsA (10mg/kg) trinta dias depois do início da investigação, (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais

Grupos*	N	Medicação (Dia zero)	Ligadura (30.º dia)
GC	10	Não	Não
GCsA	10	Sim	Não
GCsAL	10	Sim	Sim
GL	10	Não	Sim

* GC (Controle), GCsA (com CsA), GCsAL (com CsA e Ligadura), GL (com Ligadura)

4.2 ANÁLISE DO PESO CORPÓREO DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados nos dias zero, trinta e sessenta da pesquisa, para adequação da dose do medicamento aplicada e para a verificação da influência destes, sobre o ganho de peso dos animais nos diferentes grupos.

4.3 TRATAMENTO

Doses diárias de solução de CsA foram aplicadas nos animais dos grupos GCsA e GCsAL. Esse fármaco foi diluído em água destilada, na concentração de 25mg/mL, com cada dosagem na ordem de 10mg/Kg de peso do animal. A aplicação foi diária, via oral, por gavagem, pelo período de sessenta dias (Figura 2).

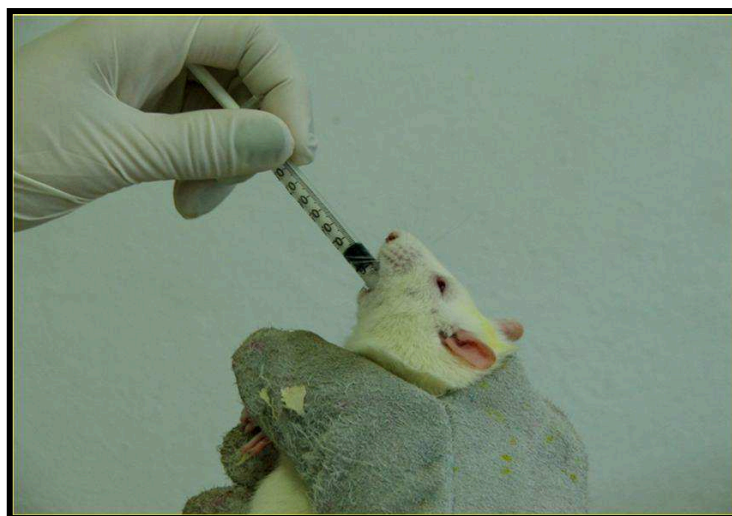


Figura 2 - Administração da CsA por gavagem

4.4 ANESTESIA

Os animais foram pesados para o cálculo da dosagem utilizada para a realização da anestesia por via intraperitoneal. Utilizou-se uma solução anestésica composta de Cloridrato de Xilazina (Virbaxil, Lab. Virbac, Roseira-SP, Brasil) com o relaxante muscular com Ketamina Base (Francator, Virbac, Roseira-SP, Brasil) como anestésico geral, na proporção de 1:0,5mL. A dose aplicada foi de 0,1mL para cada 100g de peso do animal (Figura 3), segundo protocolo anestésico para animais de pequeno porte da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).



Figura 3 - Anestesia via intraperitoneal

4.5 INDUÇÃO DA PERIODONTITE

A indução da periodontite foi realizada trinta dias após o início do experimento. Nos animais dos grupos GL e GCsAL, foi inserido um fio de linha de algodão em torno do segundo molar superior do lado direito (2ºMSD) (Figura 4), atado na vestibular, mantendo-se subgingival nas faces linguais e proximais. Esta ligadura permaneceu por um período de trinta dias.

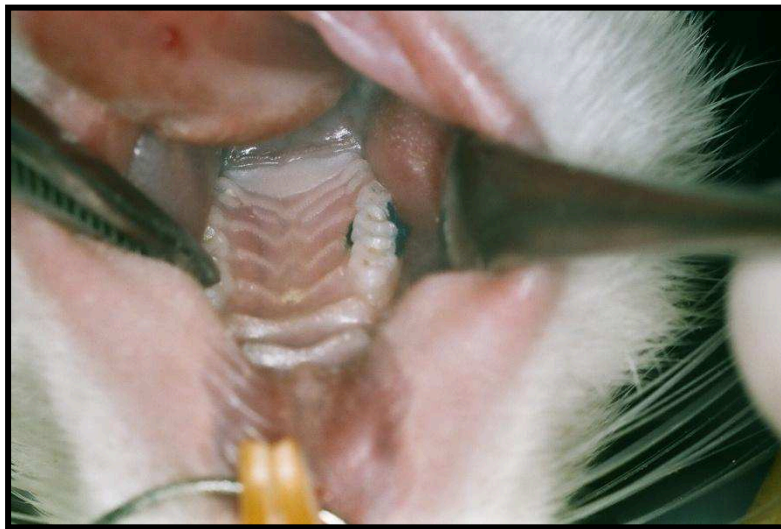


Figura 4 - Ligadura inserida no segundo molar superior direito

4.6 EUTANÁSIA

Os ratos foram previamente anestesiados e posteriormente eutanasiados por meio de perfusão cardíaca com solução de formalina 4% (Figura 5). As maxilas foram removidas e analisadas histologicamente (Figura 6).

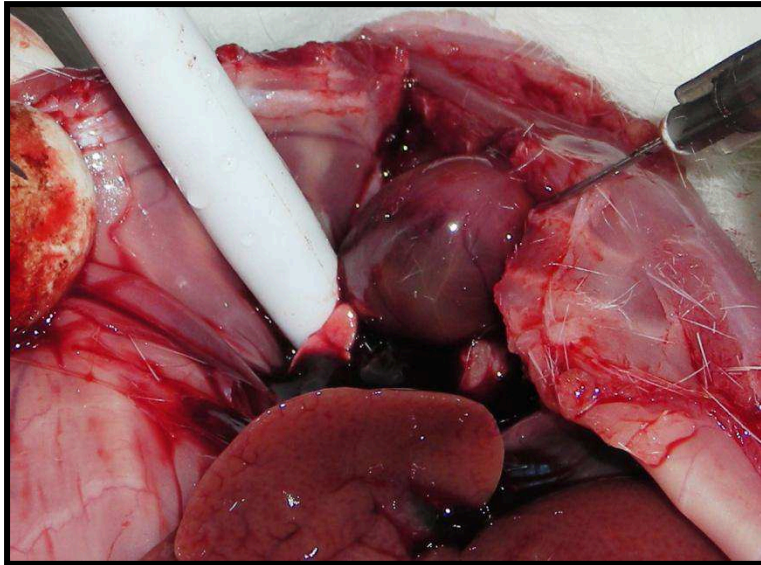


Figura 5 - Realização da perfusão cardíaca



Figura 6 - Remoção da maxila para o processamento histológico

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Após 48 horas de fixação de solução de formalina 4%, no processamento histológico, as peças passaram por descalcificação em solução de EDTA 10%. A descalcificação foi comprovada por meio do teste de penetração de agulha. Foram

realizados cortes paralelos à face mesial do 2ºMSD para determinar o sentido da inclusão da peça em parafina. Após a obtenção dos cortes semi-seriados de 5µm corados por tricrômico de Mallory e por Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), e as imagens obtidas com uma câmera digital Sony (modelo Sibershot) acoplada ao microscópio com aumento de 200x. As imagens digitalizadas foram obtidas por um software de captura de imagem *ZoomBroser EX for Windows*. Foi realizada a análise descritiva dos cortes histológicos e a análise histométrica da perda óssea nas faces livres, considerando a distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea, conforme descrito por Fernandes et al. (2007) utilizando-se o programa *Image Tool for Windows* versão 3.0, de domínio público (Figuras 7 e 8).



Figura 7 – Obtenção das imagens

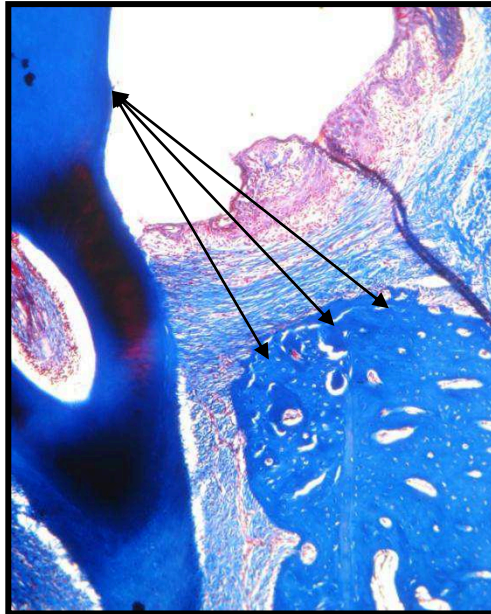


Figura 8 – Mensuração crista alveolar junção cimento/esmalte - 200x

4.8 ANÁLISE DA DENSIDADE HISTOMORFOMÉTRICA DO OSSO

A densidade óssea foi avaliada pelo cálculo da proporção entre a trabécula óssea e espaço medular. A contagem foi feita com o auxílio do programa computacional NIH *image-J* (versão Windows 3.0), de domínio público. As imagens foram obtidas com aumento de 200x do original, em cortes semi-seriados de 5 μ m, com intervalo de 60 μ m entre cada corte.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DO RANK

Foram realizados cortes com 3 μ m, total de 28 lâminas, para a marcação imunohistoquímica do RANK. Foi utilizado o anticorpo anti RANK (Abcam, Santa Cruz, CA, USA) com recuperação antigênica realizada com ácido cítrico 5% (Merck

Darmstadt, Alemanha) incubado por 15 minutos em microondas. O bloqueio da peroxidase endógena e a fixação do anticorpo primário foi realizado com a utilização do kit do Sistema Universal LSAB (Dako, Dako Co, Carpintería, CA, USA). A reação foi corada com diaminobenzidina 3% (Dako, Dako Co, Carpintería, CA, USA) e contra corada com hematoxilina de Harris (Merck Darmstadt, Alemanha).

Dois examinadores avaliaram a marcação para RANK com um sistema de escores, sendo considerada a marcação negativa (-) que caracteriza ausência de marcação; marcação fraca (+), a qual caracteriza que menos de 25% das células foi marcada; marcação moderada (++), a qual caracteriza que de 25% à 50% das células foram marcadas e; marcação forte (+++) a qual caracteriza que mais de 50% das células foram marcadas. A análise foi realizada no aumento de 400x do original (Kim et al., 2007) (Figura 9).

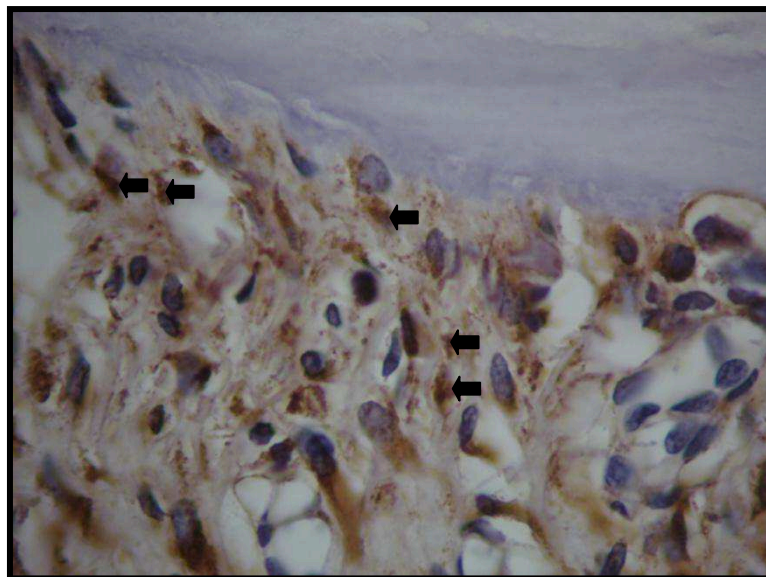


Figura 9 – Marcação imunohistoquímica do RANK - 400x

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises foram avaliados estatisticamente, considerando as variáveis a presença ligadura e/ou presença de medicamento. Com base na distribuição dos valores médios verificados em cada grupo experimental, os resultados foram estudados por meio da análise de variância (ANOVA/Tukey ou Kruskal-Wallis) utilizando o programa computacional *BioEstat for Windows 5.0*. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 PESO DOS ANIMAIS

Análise intra-grupos, demonstra que todos grupos apresentaram ganho de peso corpóreo.

Os valores médios do peso corpóreo dos animais foram calculados e submetidos à análise de variância (ANOVA), não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 2 e Figura 10).

Tabela 2 – Valores dos pesos corpóreos dos animais (mg)

Grupos	Dia 0	Dia 30	Dia 60	p
(N = 10)	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	intra-grupo
GC	268,2±17,66	366,10±21,26	413,40±31,12	0,001
GCsA	279,2±25,10	356,60±31,25	406,80±31,16	0,001
GCsAL	281,2±30,02	368,61±25,97	411,76±44,96	0,001
GL	274,6±15,55	373,73±21,26	416,40±36,75	0,001
<i>p</i>	0,328	0,233	0,861	

GC (Controle), GCsA (com CsA), GCsAL (com CsA e Ligadura), GL (com Ligadura)

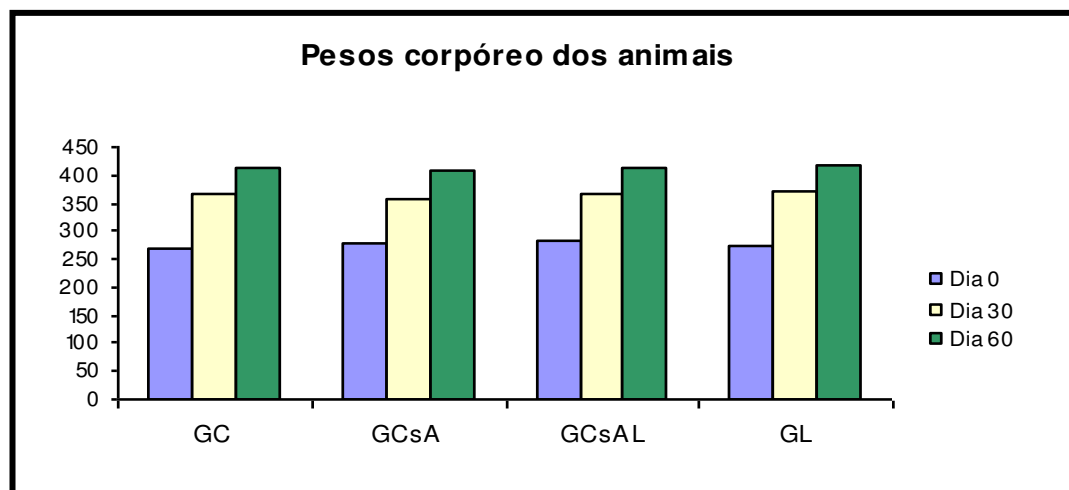


Figura 10 – Peso corpóreo dos animais (mg) por grupo

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO OSSO ALVEOLAR

5.2.1 Perda óssea lingual

Os grupos apresentaram diferença significativa quanto à perda óssea ($p=0,01$), sendo que GC ($569,13 \pm 89,76$) e GCsA ($410,90 \pm 105,95$) foram equivalentes entre si e significativamente menores que GL ($735,88 \pm 121,82$) e GCsAL ($759,38 \pm 198,23$) (Tabela 3 e Figura 11). Sendo que o grupo com ligadura e ciclosporina teve a maior proporção em comparação aos demais.

Tabela 3 – Perda Óssea Lingual (μm)

	Média \pm DP	Grupos Homogêneos*
GC	569,13 \pm 89,76	A
GCsA	410,90 \pm 105,95	A
GL	735,88 \pm 121,82	B
GCsAL	761,21 \pm 208,85	B
<i>p</i>	0,01	

GC (controle); GCsA (com CsA); GCsAL (com CsA e Ligadura); GL (com Ligadura);

* letras iguais representam ausência de diferença estatística

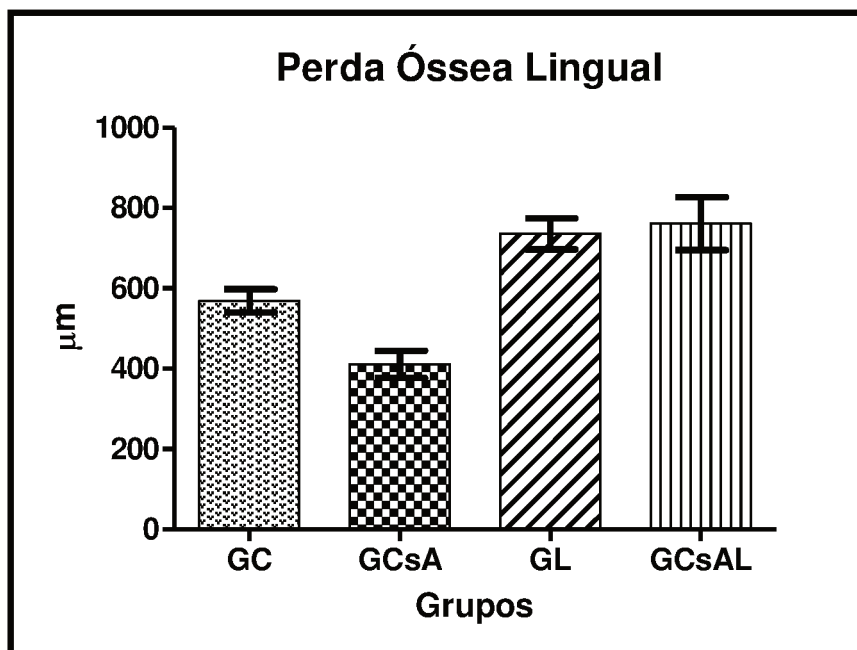


Figura 11 – Comparativo em grupos

Os cortes histológicos apresentavam fragmento de maxila contendo tecido gengival, vertentes alveolares e dentes. O tecido gengival apresentava-se revestido por epitélio o qual nos grupos GCsA, GL e GCsAL, apresentava-se com um aumento em sua espessura. Nos grupos GC e GCsA, o epitélio juncional estava posicionado junto ao espaço ocupado pelo esmalte dental e sua porção mais apical junto à união cimento-esmalte.

Nos grupos GL e GCsAL, o epitélio juncional estava posicionado junto ao cimento radicular apicalmente a união cimento-esmalte. O tecido conjuntivo que preenche o periodonto de proteção apresentava-se com feixes de fibras colágenas ocupando desde a crista da margem gengival até crista óssea e inserindo-se no cimento radicular. No ligamento periodontal pode ser observada a inserção de fibras colágenas e alguns vasos e fibroblastos e fibrócitos. No tecido ósseo das vertentes alveolares, pode ser observado alguns espaços medulares e áreas de reabsorção

ou lacunas How ship na sua superfície, associado à presença de osteoclastos caracterizadas como células multinucleares (Figura 12).

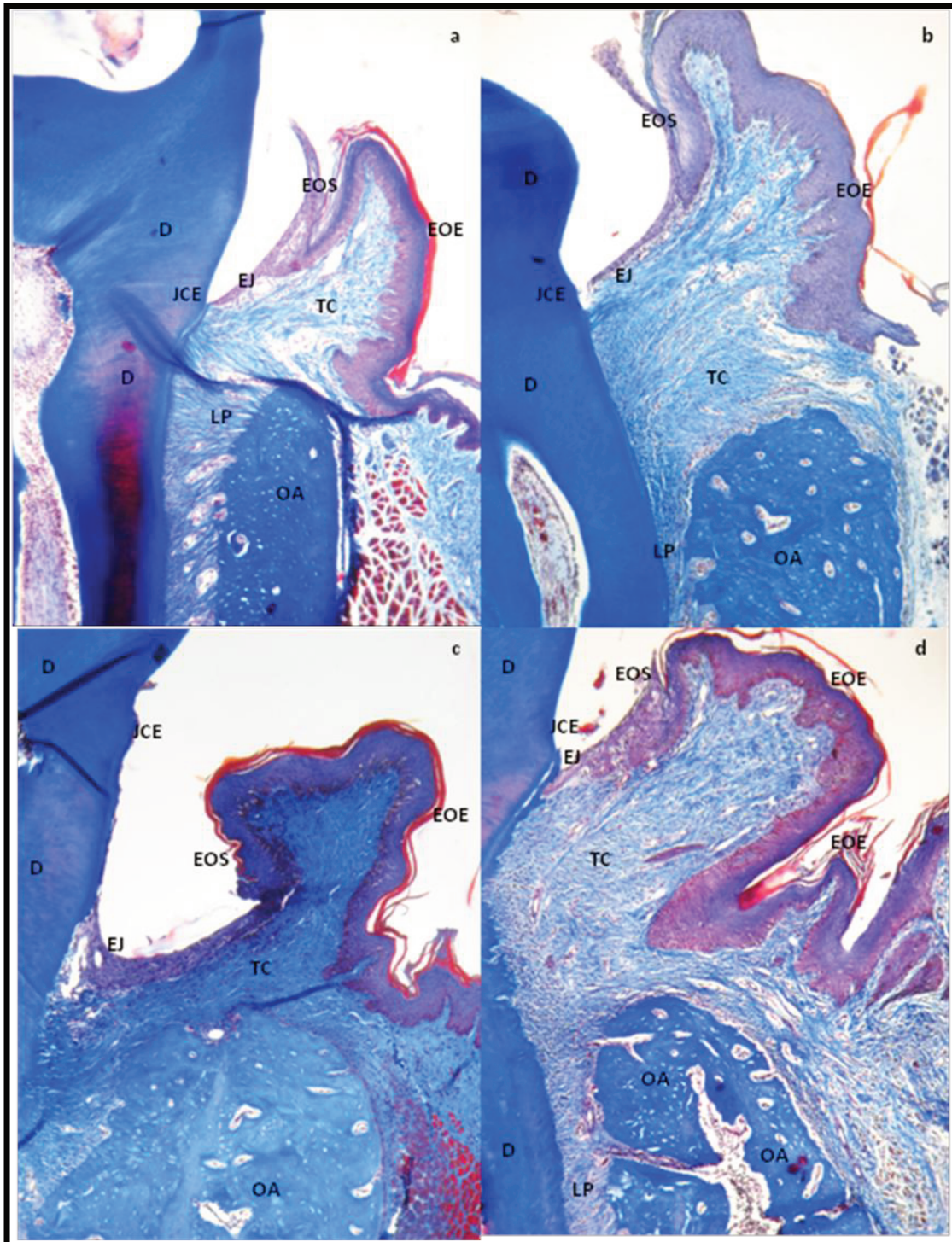


Figura 12 - Cortes histológicas descritivos dos grupos experimentais. a) GC (grupo controle); b) GCsA (grupo tratado com CsA); c) GL (grupo com ligadura); d) GCsAL (grupo tratado com CsA e com ligadura). Tricrômico Mallory 200x. (D) dentina; (JCE) junção cimento-esmalte; (EJ) epitélio juncional; (EOS) epitélio oral do sulco; (EOE) epitélio oral externo; (TC) tecido conjuntivo; (OA) osso alveolar

5.3 DENSIDADE ÓSSEA

Os valores médios obtidos com cálculo da proporção entre espaço medular e do osso trabecular por grupo foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais, sendo que o grupo com ligadura e ciclosporina teve a menor proporção em comparação aos demais (Tabela 4 e Figura 13).

Tabela 4 – Análise da proporção espaço medular/trabécula óssea (%)

GRUPOS	N	Média ± DP	Grupos Homogêneos*
GC	10	92,42 ± 2,27	A
GCsA	10	87,49 ± 4,07	B
GL	10	91,85 ± 3,91	AB
GCsAL	10	79,41 ± 3,81	C
<i>p</i>		0,001	

GC (controle); GCsA (com CsA); GCsAL (com CsA e Ligadura); GL (com Ligadura); * letras iguais representam ausência de diferença estatística

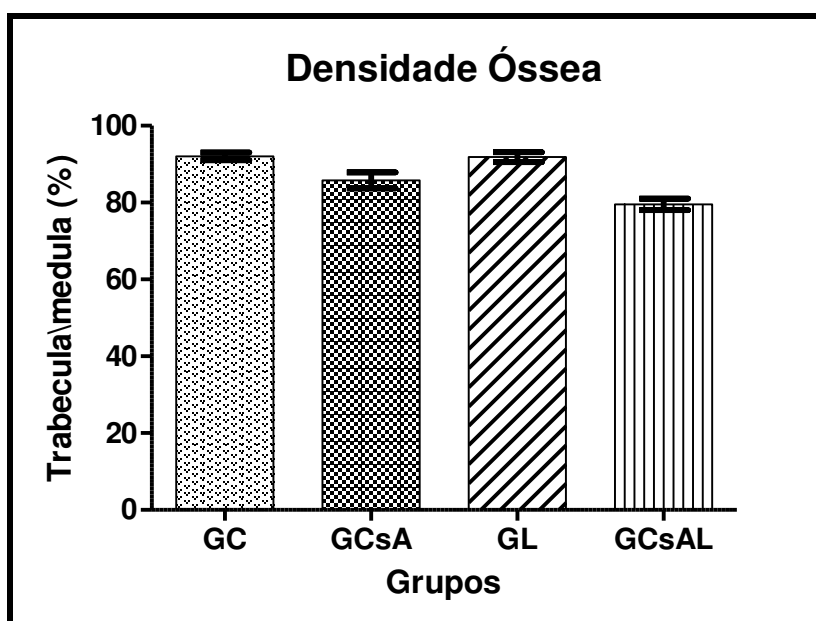


Figura 13 – Comparativo do Espaço Medular/Trabecular (%) por grupo experimental

5.4 RANK

Na marcação do RANK, os resultados mostraram-se sem diferenças significativas entre os grupos, apresentando alternância entre os espécimes e mostrando-se mais homogêneo apenas no grupo controle (Tabela 5 e Figura 14).

Tabela 5 - Distribuição das marcações para RANK

GRUPOS	GRAU DE MARCAÇÃO POR ESPECIME							
GC	++	++	++	++	+++	++	+++	
GCsA	+	++	++	+	++	+	++	
GL	++	+	+	+	+++	+	++	
GCsAL	+	++	+	++	+	+++	-	

GC (controle); GCsA (com CsA); GCsAL (com CsA e Ligadura); GL (com Ligadura)
 (-) ausência de marcação; (+) marcação leve; (++) marcação moderada; (+++) marcação forte

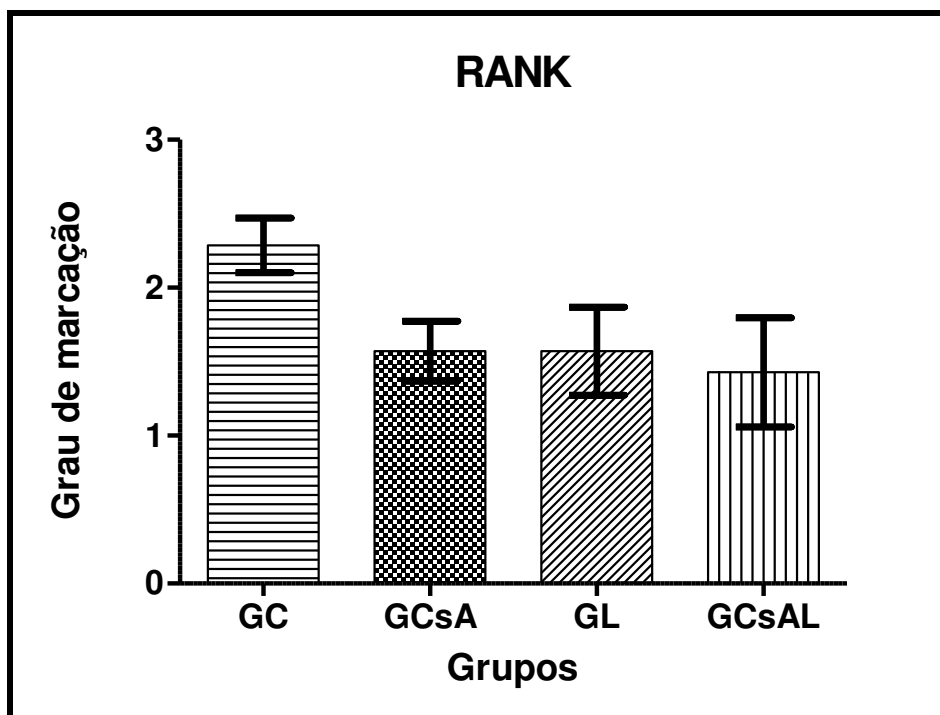


Figura 14 – Comparativo de expressão na marcação do RANK

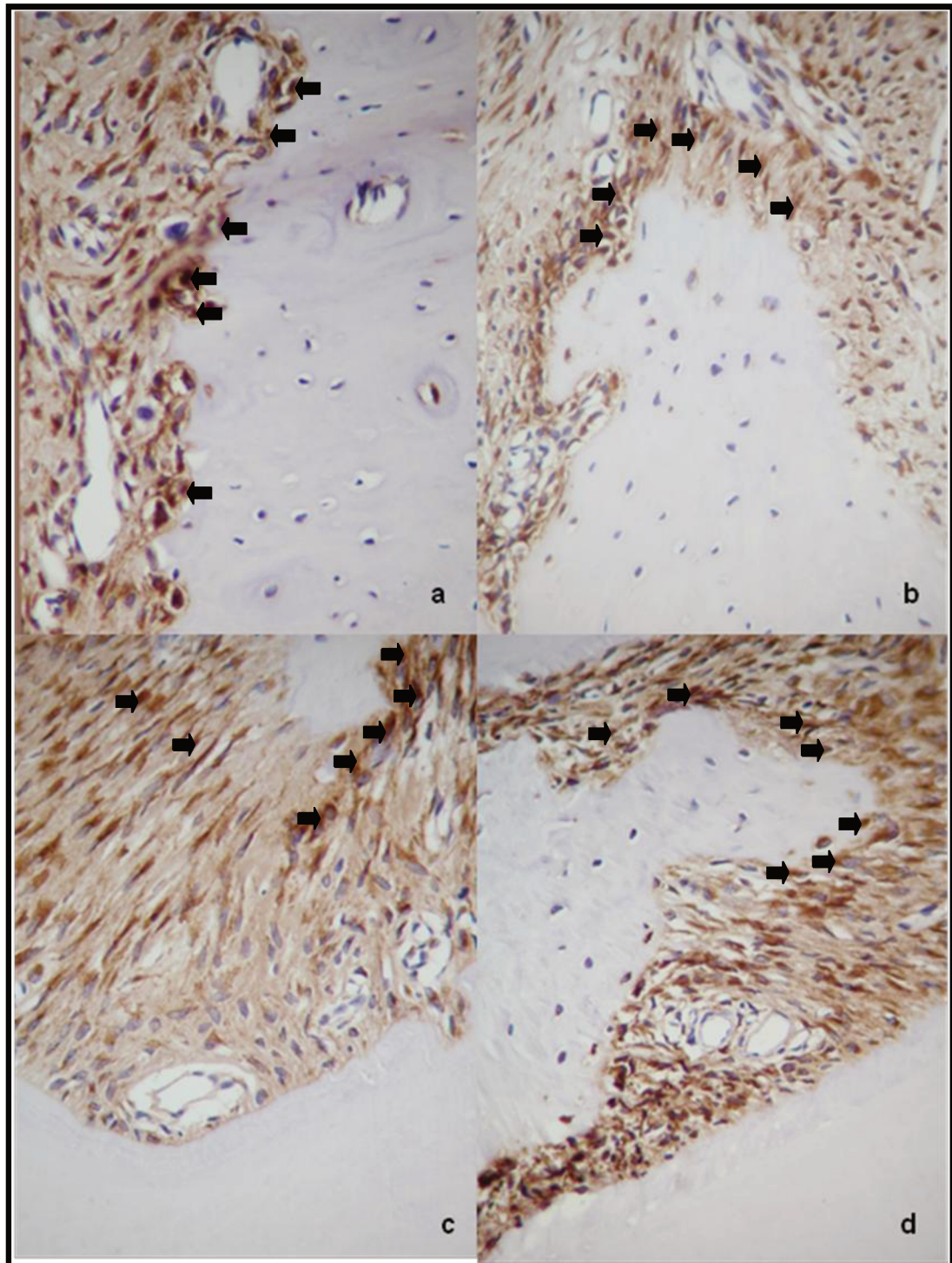


Figura 15 – Cortes histológicos corados pela imunohistoquímica para marcação de RANK. a) GC (grupo controle); b) GCsA (grupo tratado com Ciclosporina A); c) GL (grupo com ligadura); d) GCsAL (grupo tratado com CsA e com ligadura). Aumento 400x do original

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a perda óssea na periodontite induzida por ligadura em ratos imunossuprimidos pelo uso de Ciclosporina A. O modelo de indução da doença periodontal por meio da inserção de uma ligadura tem seus resultados estabelecidos e divulgados na literatura, sendo considerado seguro e eficaz no estudo da patogenia da doença periodontal (Binde et al., 2009). No presente estudo a utilização da ligadura gerou alterações como as descritas na literatura, de forma que a hipótese de que a CsA atue como fator de risco ou modificador destas alterações pode ser testado. A literatura tem descrito que a instalação de ligadura gera inflamação tecidual e perda óssea gradativa. Um achado frequente nos estudos com periodontite induzida por ligadura é a diferença no periodonto de animais que receberam ligadura e que não receberam (Marcos, 1980; Galvão et al., 2003). Da mesma forma, no presente estudo, as alterações observadas na comparação entre GC e GL estão de acordo com estes achados.

As alterações causadas pela CsA no metabolismo dos tecidos ósseos representam um efeito adverso desse fármaco e podem constituir um possível fator de risco para a doença periodontal (Stanford & Rees, 2003), favorecendo a instalação, progressão e reparo da doença periodontal. Alguns autores apresentaram aumento na reabsorção óssea e outros, diminuição da reabsorção óssea (Fu et al., 1999; Shen et al., 2001; Nassar et al., 2003; Centinkaya et al., 2006). Centinkaya et al. (2006) comentam que a inibição de atividade de reabsorção óssea mediada pela ação de linfócitos T na doença periodontal em hospedeiros imunossuprimidos pode estar associada à diminuição na reabsorção óssea

observada em alguns estudos (Nassar et al., 2004; Cetinkaya et al., 2006). Os efeitos da CsA sobre tecidos ósseos têm sido investigados por autores como estudos realizados com animais, Fu et al. (2001), Goodman et al. (2001), Spolidorio et al. (2001- 2004), Meller et al. (2002), Gonçalves et al. (2003) e Nassar et al. (2004), entre outros. Nestes estudos a utilização de ratos vem sendo justificada pela semelhança entre a estrutura periodontal do animal e do homem, conforme descrito Klausen et al. (1989) e Page & Schroder (1982).

Exemplos de divergências entre resultados descritos na literatura são os achados de Gonçalves et al. (2003), no qual a periodontite induzida por ligadura associada ao uso de CsA gerou maior perda óssea em dentes com ligadura comparados aos sem ligadura, ou os achados de Cetinkaya et al. (2006) no qual a presença de CsA associada à presença de ligadura diminuiu a perda óssea decorrente da doença periodontal (Gonçalves et al., 2003; Centikaya et al., 2006).

No presente estudo a instalação da ligadura foi determinante no aumento da perda óssea mais do que a presença de CsA. A reabsorção óssea decorrente da doença periodontal é resultado de um desequilíbrio entre a ação de osteoclastos e osteoblastos, na reabsorção e formação óssea e tem sido associada à presença de vários fatores estimuladores da osteoclastogênese (Liang et al., 2008). Estudos nos quais a reabsorção óssea foi estimulada in vivo e in vitro *demonstraram* que os linfócitos T e B expressam alguns fatores como TGF- β e estão fortemente associados ao início da reabsorção óssea na doença periodontal (Goodman et al., 2001; Van Dyke, 2007). A diminuição da diferenciação de linfócitos T frente à presença de imunossupressores, como a CsA têm sido descrita como uma das justificativas da diminuição na reabsorção óssea (Roodman, 1999; Nassar et al., 2004; Santos et al., 2009).

Estudos que investigaram a associação entre o uso de CsA e a perda de densidade óssea demonstraram alterações teciduais como: diminuição do osso alveolar, aumento do volume de osteoclasto, diminuição da medula e da relação da superfície óssea saudável/erosão na superfície mesial (Nassar et al., 2004). Já outros autores, utilizando a CsA em óleo mineral e associada a outro fármaco (alendronato) observaram diminuição não significativa do volume do osso alveolar, aumento na osteoclasia e redução na formação óssea (Fu et al., 1999; Spolidorio et al., 2007). No presente estudo os resultados sugerem que a exposição prévia a CsA esteve associada à menor densidade óssea. Porém, essa exposição não contribuiu para o aumento da reabsorção óssea ou para a progressão da doença.

Estudos como os de Gonçalves et al. (2003) demonstraram que o uso de CsA, quando comparado ao uso de outros fármacos como a nifedipina, apresentou-se equivalente quanto à perda do osso alveolar (Gonçalves et al., 2003). Da mesma forma, a diminuição do osso alveolar e o aumento no número de osteoclastos foi observado em estudos nos quais foi utilizada a CsA associada ou não à presença de inflamação periodontal induzida por ligadura em diferentes tempos de tratamento (Nassar et al., 2004; Spolidorio et al., 2004). No presente estudo, a utilização de CsA como imunossupressor foi realizada por trinta dias e mantida por mais trinta dias juntamente com a indução da doença periodontal. Este protocolo sugere uma situação de maior aplicabilidade de resultados para circunstâncias clínicas nas quais a exposição ao fator de risco, uso de imunossupressor, não ocorre simultaneamente ao início da doença periodontal.

O tempo de uso da CsA também foi associado aos efeitos por ela gerados. Num estudo em ratos com 45 dias, os efeitos do uso da CsA não influenciaram a perda óssea alveolar mais do que outro fármaco; com sessenta dias, observaram-se

nova formação óssea e perda óssea; após 180 e 240 dias de aplicação, verificou-se aumento no volume do tecido ósseo (Gonçalves et al., 2003; Spolidorio et al., 2004; Centikaya et al., 2006). Já em outros estudos, foi observado que a exposição prévia da CsA no início do experimento e seus efeitos no osso alveolar de ratos demonstraram relação entre densidade e perda óssea de forma antagônica quando comparados com os grupos controle e ligadura (Spolidorio et al., 2001; Nassar et al., 2004).

A remodelação óssea é um evento biológico regido por uma série de mediadores químicos formados a partir de processos fisiológicos e modificados em diferentes condições patológicas. Nesta cascata de eventos, a ação dos osteoblastos e a expressão de mediadores como RANK, RANKL e OPG, citocinas produzidas por células ósseas, são fundamentais para regulação e diferenciação das células osteoclásticas. Estas proteínas são precursoras da remodelação óssea e do desenvolvimento de vários tipos de células hematopoéticas e também regulam a maturação de osteoclastos (Lossdorfer et al., 2002; Spahni et al., 2009). Desta forma, podemos considerar que RANK, RANKL e OPG são fatores críticos para o controle da atividade osteoclástica, sugerindo suas funções vitais na progressão da perda óssea na periodontite (Wara-aswapati et al., 2007). A participação destas citocinas é fundamental para a remodelação óssea, e regula a interação entre os linfócitos T e células dendríticas. Além disso, são essenciais para o desenvolvimento e para a ativação de osteoclastos e perda óssea em processos inflamatórios. Além dos osteoblastos, os linfócitos T são células que expressam RANKL e, desta forma, também influenciam o recrutamento de novos osteoclastos, sendo então importantes reguladores da reabsorção e neoformação óssea (Ramalho et al., 2000; Golmia et al., 2004; Takayanagi, 2005; Kawai et al., 2006).

Na avaliação da formação óssea em modelos animais no qual foi associado à instalação de implantes seguidos por terapia, observou-se uma significativa expressão do RANK no grupo experimental quando comparado ao controle (Kim et al., 2007). No presente estudo, a expressão de RANK apresentou comportamento divergente destes achados. Podemos considerar que a imunossupressão gerada pela exposição a CsA inibiu a diferenciação de linfócitos T e por consequência, diminuiu a possibilidade de expressão de RANK, fazendo com que o grupo controle apresentasse a distribuição mais homogênea para esta marcação. Estes resultados estão de acordo com os achados de alguns estudos nos quais após a exposição a CsA não foi observada influência direta sobre a perda óssea alveolar, considerando-se que o RANK apresentou-se mais expressivo nos efeitos da osteoclastogênese, participando diretamente na remodelação óssea, e por consequência, da melhora na densidade óssea. (Ramalho et al., 2000; Teitelbaum, 2000; Takayanagi, 2005; Liang et al., 2008).

Baseados nos resultados observados neste estudo podemos considerar que a imunossupressão gerada pela exposição a CsA acarretou a diminuição da densidade óssea, porém, não influenciou a marcação pelo RANK ou mesmo a perda óssea decorrente da inflamação periodontal induzida por ligadura em ratos.

7 CONCLUSÃO

A exposição prévia à CsA levou à menor densidade óssea, mas não acarretou maior perda óssea alveolar nos animais em que foi induzida a periodontite experimental.

A marcação da expressão de RANK não foi influenciada pela presença de inflamação ou exposição a CsA.

REFERÊNCIAS

1. Nassar PO, Nassar CA, Spolidorio LC. Efeito da Ciclosporina A sobre o metabolismo Ósseo Alveolar. *Rev Gaucha de Odont* 2003; 55: 435-438.
2. McCauley IK, Rosol TJ, Capen CC. Effects of cyclosporin A on rat osteoblasts (RQS 17/2, 8 cells) in vitro. *Calcif Tissue Int* 1992; 51: 291-297.
3. Stewart PJ, Green OC, Stern PH. Cyclosporine A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 1989; 1: 285-291.
4. Klaushofer K, Hoffmann O, Stewart PJ, Czerwenka E, Koller K, Stern PH. Cyclosporine A inhibits bone resorption in cultures neonatal mouse calvaria. *J Pharmacol* 1987; 243: 584-90.
5. Wilmink JM, Bras J, Surachno S, van Heyst JL, van der Horst JM. Bone repair in cyclosporin – treated renal transplant patient. *Transplant Proc* 1989; 21: 1492-1494.
6. Li XQ, Stevenson S, Klein L, Davy DT, Shaffer JW, Goldberg VM. Differential patterns of incorporation and remodeling among various types of bone grafts. *Acta Anat*: 1991; 140: 236-244.
7. Cueto-Manzano AM, Konel S, Hutchison AJ, Crowley V, France MW, Freemont AJ, et al. Bone loss in long-term renal transplantation: histopathology and desitometry analysis. *Kidney Int* 1999; 55: 2021-2029.
8. Fu E, Hsieh YD, Nieh S, Wikesjo UM, Liu D. Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. *J Periodontol* 1999; 70: 189-194.
9. Goodman GR, Dissanayake IR, Ma Y, Jee WS, Bryer HP, Epstein S. Transforming growth factor- β administration modifies cyclosporine A-induced bone loss. *Bone* 2001; 28: 583-588.

Referências elaboradas segundo o modelo Vancouver

10. Zeni SN. Olpradonate prevents the bone loss induced by cyclosporine in the rat. *Calcif Tissue Int. New York*; 2002; 70: 48-53.
11. Cetinkaya BO, Acikcoz G, Keles GC, Ayas B, Korkmaz A. The effect of Cyclosporin A on alveolar bone in rats subjected to experimental periodontal disease. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 716-72.
12. Shen EC, Fu E, Hsieh YD. Effects of Cyclosporin A on dental alveolar bone: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol* 2001; 72: 659-665.
13. Spolidorio LC, Spolidorio DM, Nasar PO, Nassar CA, Hoslzhausen M, Almeida OP. Influence of age on combined effects of Cyclosporin and Nifedipine on rat alveolar bone. *J Periodont* 2004; 75: 268-272.
14. Gonçalves PF, Nogueira Filho GR, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FHJr. Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis – a study in rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17: 46-50.
15. Klausen B, Evans RT, Sfintescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scand J Dent Res* 1989; 97: 494-499.
16. Itoiz MA, Carranza FAJ. A gengiva. In: Carranza FA, Newman MG. *Periodontia Clínica*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.11.
17. Lindhe J, Karring T, Araujo M. Anatomia dos tecidos periodontais. In: Lindhe J, trad. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010a. p.3.
18. Lindhe J, Berglundh T, Wennstrom JL. A mucosa em torno de dentes e de implante. In: Lindhe J, trad. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010b. p.66.

19. Wolf HF, Edith M, Rateitschak KH. Periodontia. Fruchi LC, trad. Porto Alegre: Artmed; 2006.
20. Sodek J, McKee D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology 2000* 2000; 24: 99-128.
21. Ryder MI. Anatomia, desenvolvimento e fisiologia do periodonto. In: Rose LR, Mealey BL, Genco RJ, Orgs. *Periodontia: medicina, cirurgia e implantes*. São Paulo: Santos; 2007. p. 2.
22. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and others animals. A comparative review. New York: National Library; 1982.
23. Martins MD, Russo MP. Mecanismos indiretos de atuação dos patógenos periodontais no processo saúde-doença periodontal. In: Martins MD, Russo MP. *Periodontia médica. Uma abordagem integrada*. São Paulo: Senac; 2004. p. 59-88.
24. Van Dyke TE. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontology 2000* 2007; 45: 10-13.
25. Duarte PJ, Sallum AW, Duarte FF, Sallum EA. Avaliação radiográfica da ação da ciclosporina na evolução da doença periodontal (estudo em ratos). *Revista Periodontal 2000*; jan/jun: 1-13.
26. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006 Sep; 169(3): 987-98.
27. Hepp V, Tramontina VA, Bezeruska C, Vianna GP, Kim SH. Periodontite agressiva: relato de casos e revisão da literatura. *Rev Clín Pesq Odontol* 2007 jan/abr; 3(1): 23-31.
28. Cortelli SC, Cortelli JR, Aquino DR, Holzhausen M, Franco GCN, Costa FO, et al. Clinical status and detection of periodontopathogens and *Streptococcus mutans* in children with high levels of supragingival biofilm. *Braz Oral Res* 2009; 23(3): 313-318.

29. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991; 62: 59-73.
30. Marcos B. Perda óssea. Mobilidade. Migração. In: Marcos B. Periodontia. Um conceito clínico-preventivo. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1980. p.161-169.
31. Qiming J, Cirelli JA, Ho Park HC, Sugai JV, Taba JR. M, Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol* 2007; 78: 1300-1308.
32. Santos RL, Gonçalves RT, Martins MA, Souza MMG. Influência dos imunossupressores no metabolismo ósseo e movimento dentário: revisão da literatura. *Rev Odonto Cienc* 2009; 24(1): 896-991.
33. Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclasts, macrophages and the molecular mechanisms of bone resorption. *J Leukocyte Biol* 1997; 61: 381-388.
34. Souza DM, Rosa LP, Ricardo LH, Moraes LC, Rocha RF. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. *Cienc Odontol Bras* 2005; 8(4): 77-84.
35. Amadei SU, Sarmiento VA, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42(1): 5-12.
36. Binde AT, Rocha RF, Alonso JMSL, Rovai ES, Brandão AAH. Considerações histológicas para periodontite induzida por meio de ligadura em ratos. [citado 2009 dez 17]. Disponível em: URL: <http://www.prope.unesp.br>.
37. Keles GC, Aeikgoz G, Ayas B, Sakallioğlu E, Firatlı E. Determination of systemically & locally induced periodontal defects in rats. *Indian J Med Res* 2005; 121: 176-184.
38. Galvão MPA, Chapper A, Rösing CK, Ferreira MBC, Souza MAL. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17(1): 56-62.

39. Fernandes MI, Gaio EJ, Opperman RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analysis of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2007; 21(3): 216-221.
40. Souza DM, Ricardo LH, Kantoski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2009; 23(3): 326-332.
41. Nassar CA, Nassar PO, Abi Rached RSG, Holzhausen M, Marcantonio EJr, Spolidorio LC. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. *J Periodont Res* 2004; 39: 143-148.
42. Stanford TW, Rees TD. Acquired immune suppression and other risk factors/indicators for periodontal disease progression. *Periodontology* 2000 2003; 118:135.
43. Barclay S, Thomason JM, I JR, Seymour RA. The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 311-314.
44. Seymour RA. Calcium channel blockers and gingival overgrowth. *Br Dent J* 1991; 170: 376-379.
45. King GN, Fullinfaw R, Higgins TJ, Walker RG, Francis DMA, Wiesenfeld D. Gingival hyperplasia in renal allograft recipients receiving cyclosporin - A and calcium antagonists. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 286-293.
46. Ilgenli T, Atilla G, Baylas H. Effectiveness of periodontal therapy in patients with drug-induced gingival overgrowth. Long-term results. *J Periodontol* 1999; 70: 967-972.
47. Bach JF. Lessons for transplant immunosuppression from the usage of cyclosporin in autoimmune diseases. *Transplant Proc* 1994; 26: 3077-3081.
48. Seymour RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol* 1992; 1: 1-11.

49. Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 2000; 27(4): 217-223.
50. Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 165-175.
51. Chabria D, Weintraub RG, Kilpatrick NM. Mechanisms and management of gingival overgrowth in pediatric transplant recipients: a review. *Int J Pediatric Dent* 2003; 3: 220-229.
52. Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS, Kelly PJ, Parry G, Dark J, et al. Determinants of gingival overgrowth severity in organ transplant patients. An examination of the role of HLA phenotype. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 628-634.
53. Wada C, Kataoka M, Seto H, Hayashi N, Kido J, Shinoara Y, et al. High-turnover osteoporosis is induced by Cyclosporin A in rats. *J Bone Miner Metab* 2006; 24: 199-205.
54. Hyland PL, Traynor PS, Myrillas TT, Marley JJ, Linden GJ, Winter P, et al. The effects of Cyclosporin on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2003; 74: 437-445.
55. Romito GA, Lotufo RFM, Saraiva L. Microorganismos superinfectantes em pacientes submetidos a terapia com Ciclosaporina-A e sua correlação gengival. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 1791: 35-40.
56. Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS. Risk factors for gingival overgrowth in patients medicated with ciclosporin in the absence of calcium channel blockers. *J Clin Period* 2005; 12: 272-279.
57. Yamada H, Nishimura F, Naruishi K, Chou HH, Takashiba SA. Phenytoin and Cyclosporin A suppress the expression of MMP-1, TIMP-1 and cathepsin L, but not cathepsin B in cultured gingival fibroblasts. *J Period* 2000; 71: 955-960.


58. Neves KA. Ciclosporina, ossos, interleucinas, fator de necrose de tumor, oxido nitrico. 2006. [citado 2009 dez 27] Disponível em: URL:<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000437546>.
59. Goodman IR, Dissanayake AR, Bowman AR, Pun S, Ma Y, Jee WSS, et al. Transforming growth factor- β administration modifies Cyclosporine A-induced bone loss. *Bone* 2001; 28(6): 583-588.
60. Spolidorio LC, Merzel J, Villalba H, Vargas PA, Coletta RD, Almeida OP. Morphometric evaluation of gingival overgrowth and regression caused by cyclosporin in rats. *J Periodont Res* 2001; 36: 384-389.
61. Meller AT, Rumjanek VM, Sansone C, Allodi S. Oral mucosa alterations induced by cyclosporine in mice: morphological features. *J Periodont Res* 2002; 37: 412-415.
62. Sakakura CE, Margonar R, Sartori R, Morais JA, Marcantonio EJr. The influence of Cyclosporin A on mechanical retention of dental implants previously integrated to the bone: a study in rabbits. *J Periodontol* 2006; 77: 2029-2062.
63. Asahara Y, Nishimura F, Yamada H, Naruishi K, Kataoka M, Kido J, et al. Mast cells are not involved in the development of Cyclosporin A-induced gingival hyperplasia: a study with mast cell-deficient mice. *J Periodontol* 2000; 71: 1117-1120.
64. Fu E, Hsieh YD, Mao TK, Shen EC. A histomorphometical investigatyion of the effect of cyclosporin in trabecular bone of the rat mandibular condyle. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 1105-1110.
65. Spolidorio LC, Marcantonio EJr, Spolidorio DM, Nassar CA, Nassar PO, Marcantonio RA, et al. Alendronate therapy in Cyclosporin-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontol* 2007; 42: 466-473.
66. Shen EC, Fu E, Hsieh YD. Effects of Cyclosporin A on dental alveolar bone: a histomorphometric study in rats. *J Period* 2001; 72: 659-665.

67. Centinkaya BO, Acikgoz G, Aydin O, Korkmaz A, Keles GC. The relationship between proliferating cell nuclear antigen expression and histomorphometrical alteration in Cyclosporin-A induced gingival overgrowth in rats. *Toxicol Path* 2006; 34: 180-186.
68. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical Therapy* 2006; 86(1): 77-91.
69. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology* 1999; 17: 1229-1241.
70. Ramalho ACR, Lazaretti-Castro M, Cohen-Solal ME, Vernejoul MC. Por que estrógeno e raloxifeno melhora a densidade mineral óssea? *Arq Bras Endocr Metab* 2000; 44 (6): 471-82.
71. Golmia R, Scheinberg M. Atualização em osteoprotegerina. *Einstein* 2004; 2(3): 220-221.
72. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Period* 2005; 76: 2033-2041.
73. Han X, Kawai T, Taubman MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontol* 2000 2007; 45: 76-94.
74. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Period Res* 2005; 40(4): 287-293.
75. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK Interaction. *J Exp Med* 2000; 191(2): 275-85.
76. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Horndee D, Lu H, Kunze M, et al. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Period* 2007; 43: 65-84.

77. Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadom A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyomonas gingivalis*. *J Periodontol* 2007; 78: 1062-1069.
78. Liang L, Yu J, Wang Y, Yu J, Ding Y. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *J Periodontol* 2008; 79: 1745-1751.
79. Tyrovola JB, Spyropoulod MN, Makon M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci* 2008; 50: 367-376.
80. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A . Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor KappaB and its ligand in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 2002; 71: 45-52.
81. Spahni AI, Schawalder P, Rothen B, Rothen B, Bosshardt DD, Lang N, et al. Immunohistochemical localization of RANK, RANKL and OPG in healthy and arthritic canine elbow joints. *Veterinary Surgery* 2009; 38: 780-786.
82. Tobón-Arrouave SI, Franco-González LM, Isaza-Guzmán DM. Immunohistochemical expression of RANK, GRX and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. *Oral Oncol* 2005; 41: 480-488.
83. Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, et al. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: na experimental study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* 2007; 39: 441-450.
84. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1507.
85. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83: 166-169.
86. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF Kappa B Ligand in rat periapical lesions. *JOB* 2005; 51(8): 574-579.

ANEXO

ANEXO A – Declaração do Comitê de Ética para Experimentação Animal



UNIVERSIDADE TAUBATÉ
Autarquia Municipal de Regime Especial
Reconhecida pelo Dec. Fed. Nº 78.924/76
Recredenciada pela Portaria CEE/GP nº 30/03

COMITÊ DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Avenida Tiradentes, 500 - centro - CEP 12030-180 - Taubaté - SP - Brasil
Tel. (12) 3629-7909

DECLARAÇÃO

Registro CEEA/UNITAU nº 0019/06 (esse nº de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto).

Projeto de Pesquisa: *Influência da ciclosporina nos tecidos periodontais em periodontite induzida.*

Pesquisador(a) Responsável: Lucilene Hernandes Ricardo

Apresentar relatório final ao término da pesquisa.

O Comitê de Ética para Experimentação Animal, em reunião de 15/12/2006 e no uso das competências definidas na Deliberação CONSEP Nº 362/2003, considerou o Projeto acima **aprovado**.

Taubaté, 15 de dezembro de 2006.



Profª Drª Naira Correa Cusma Pelogia
Coordenador do Comitê de Ética para Experimentação Animal
Universidade de Taubaté

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor.

Hilson Fernando Resende Nogueira

Taubaté, _____