

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Felipe da Silva Peralta**

**INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EM  
RATOS PREVIAMENTE EXPOSTOS À  
CICLOSPORINA A**

**Taubaté - SP**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Felipe da Silva Peralta**

**INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EM  
RATOS PREVIAMENTE EXPOSTOS À  
CICLOSPORINA A**

Dissertação apresentada para obtenção do  
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**

**2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo  
SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU**

P426i

Peralta, Felipe da Silva

Indução de doença periodontal em ratos previamente expostos à ciclosporina A / Felipe da Silva Peralta. - 2008.

94f.:il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Taubaté, Programa de Pós-graduação em Odontologia, 2008.

Orientação: Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo, Departamento de Odontologia.

1. Ciclosporina A. 2. Aumento gengival. 3. Perda óssea alveolar.  
4. Estudo em animais. 5. Osteoporose. I. Título.

**FELIPE DA SILVA PERALTA**

**INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS PREVIAMENTE EXPOSTOS  
À CICLOSPORINA A**

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

Data: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008

Resultado: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade de Taubaté  
Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_  
Assinatura \_\_\_\_\_

Profa. Dra. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_  
Assinatura \_\_\_\_\_

Dedico aos meus pais, Marcos Ferreira Peralta e Yvone da Silva Peralta, todas as conquistas que realizo em minha vida, pois é através de muito amor, que tudo se torna possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as graças que recebo em minha vida, pelo seu amor incondicional que transforma o meu coração.

À minha irmã Alyne Peralta Rosa, por todo o seu carinho e apoio, que faz com que eu siga com orgulho meus projetos, meus sonhos.

Especialmente à professora Lucilene Hernandes Ricardo, pelo seu exemplo de vida, pela sua coragem e pela sua força. Por sempre continuar lutando e por acreditar em mim. Agradeço pelos seus ensinamentos, que são mais do que orientações de um Mestrado, são palavras e atos para se lembrar por toda vida.

Agradeço a professora Débora Pallos por ter me ajudado em tudo que foi possível durante esse trabalho. Sou grato pela sua amizade e sua alegria, que faz com que seja uma pessoa única, invejável.

À professora Marinella Holzhausen, que com toda a sua simplicidade e delicadeza, ensina, encanta, e faz entender que o papel do mestre é escrito com amor e dedicação.

A todos os professores que participaram diretamente de mais essa conquista: Prof. Dr. Celso Queiros, Profa. Dra. Daniela Martins de Souza, Prof. Dra. Ana Lia Anbinder, Profa. Dra Poliana Mendes Duarte, Profa. Dra. Regina Cuba.

A Universidade de Taubaté e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, na figura dos Professores José Roberto Cortelli, Sheilla Cavalca Cortelli e Ana Cristina Claro Neves, por toda organização e seriedade no decorrer do nosso curso. Agradeço também a disponibilidade da bolsa de estudo que viabilizou a realização de mais essa etapa.

A todos os amigos da turma de Mestrado, pela amizade e pelo carinho durante o nosso convívio. Ao amigo Renato Zanotta Rebelo pelo companheirismo e por toda sua participação na realização desse trabalho.

A todos os professores e funcionários da UNITAU por todo esforço e dedicação à nossa turma de Mestrado. Agradeço a técnica do Laboratório de Histologia Maria de Fátima Pacheco pela atenção e disponibilidade dispensada durante a execução do nosso trabalho.

Agradeço as secretárias Adriana Peloggia e Alessandra Borges Serra, por toda atenção e dedicação aos alunos.

Aos funcionários e amigos do Biotério da Universidade de Taubaté, por toda ajuda e interesse que tiveram pelo nosso trabalho.

Agradeço a CAPES pela disponibilidade da bolsa de estudo que muito contribuiu para a execução desse trabalho.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José dos Campos, na figura da Profa. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho por disponibilizar o Laboratório de Patologia para o nosso estudo.



Quando alguém evolui, evolui tudo  
que está a sua volta.

Paulo Coelho

## RESUMO

A Ciclosporina A (CsA) é o medicamento de escolha utilizado no controle da rejeição de órgãos em pacientes transplantados. Efeitos adversos associados ao fármaco, como alterações ósseas e o aumento gengival são fatores de risco para a doença periodontal. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da indução de doença periodontal no tecido ósseo, tecido epitelial e tecido conjuntivo de ratos previamente tratados com a CsA. Foram utilizados quarenta ratos Wistar, com 12 semanas de vida, divididos em quatro grupos (n=10): grupo Controle (GC); grupo Ciclosporina A (GCsA), administração de 10mg/kg de CsA durante sessenta dias a partir do início do experimento; grupo Ciclosporina A – Ligadura (GCsAL), inserção da ligadura após trinta dias do início do experimento e administração de 10mg/Kg de CsA desde o início do experimento, durante sessenta dias; grupo Ligadura (GL), inserção da ligadura após trinta dias do início do experimento. Os animais foram sacrificados após sessenta dias por meio de perfusão cardíaca para a realização da análise histológica e histomorfométrica do tecido gengival e tecido ósseo, análise radiográfica do suporte ósseo periodontal e da densidade radiográfica e análise bioquímica da Fosfatase Alcalina. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Tukey) a 5% e ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os valores médios para GC ( $60.5 \pm 2.22\%$ ) e GCsAL ( $58.1 \pm 2.24\%$ ) foram equivalentes entre si para o suporte ósseo periodontal e diferentes de GCsA ( $55.0 \pm 4.44\%$ ) e GL ( $54.8 \pm 3.11\%$ ) ( $p=0.0007$ ). Os valores médios da densidade radiográfica não apresentaram diferença estatística significativa ( $p=0.1776$ ). Em relação à fosfatase alcalina, novamente não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p=0.2806$ ). Os valores médios de células TRAP+ por grupo experimental, não apresentaram diferença estatística significativa ( $p=0.3995$ ). Os valores médios para GC ( $0.29 \pm 0.03\text{mm}^2$ ) e GCsA ( $0.30 \pm 0.02\text{mm}^2$ ) foram equivalentes entre si para a área do ligamento periodontal e diferentes de GCsAL ( $0.43 \pm 0.17\text{mm}^2$ ) e GL ( $0.41 \pm 0.11\text{mm}^2$ ) ( $p=0.3994$ ). Na área total do tecido gengival, os valores médios para GCsA ( $0.088 \pm 0.033\text{mm}^2$ ) e GL ( $0.101 \pm 0.034\text{mm}^2$ ) foram equivalentes entre si e diferentes de GC ( $0.053 \pm 0.020\text{mm}^2$ ) e GCsAL ( $0.146 \pm 0.047\text{mm}^2$ ) ( $p=0.000001$ ). Na proporção área do conjuntivo e área total, os valores médios para GC ( $28.60 \pm 8.64\%$ ) foi equivalente ao GCsA ( $32.72 \pm 14.13\%$ ) e diferente do GCsAL ( $38.50 \pm 10.98\%$ ) e GL ( $37.70 \pm 7.49\%$ ) ( $p=0.0093$ ). Em relação à proporção área do epitélio e área total, os valores médios para GC ( $71.39 \pm 8.64\%$ ) foi equivalente ao GCsA ( $67.27 \pm 14.13\%$ ) e diferente do GCsAL ( $61.49 \pm 10.98\%$ ) e GL ( $63.37 \pm 7.44\%$ ) ( $p=0.0142$ ). Na proporção área do epitélio e área do conjuntivo, os valores médios para GC ( $2.80 \pm 1.13$ ) foi equivalente ao GCsA ( $2.18 \pm 1,32$ ) e diferente do GCsAL ( $1.89 \pm 1.17$ ) e GL ( $1.81 \pm 0.80$ ) ( $p=0.0334$ ). Baseados nestes resultados pode-se concluir que a exposição prévia a CsA não modificou significativamente a evolução da doença periodontal induzida em ratos.

**Palavras-chave:** Ciclosporina A. Aumento gengival. Perda óssea alveolar. Estudo em animais. Osteoporose.

## ABSTRACT

Cyclosporine A (CsA) is the drug of choice used to prevent organ transplant rejection. Side effects associated to the drug, like bone alterations and gingival overgrowth are considered risk factors to periodontal disease. The objective of the present study was to evaluate the effect of periodontal disease on the bone tissue, epithelial tissue and connective tissue of the rats previously treated with CsA. Forty Wistar rats with 12 weeks were divided into four groups: Control Group (CG, n=10); CsA Group (CsAG, n=10), with CsA (10mg/kg) administration during 60 days since the beginning of the experiment; CsA and Ligature Group (CsALG, n=10), with ligature placement at 30 days after the beginning of the experiment with CsA administration during the whole period; and, Ligature Group (LG, n=10), with ligature placement at 30 days after the beginning of the experiment. After blood sample collection for the biochemical analysis of the Alkaline Phosphatase (PA) activity, the animals were sacrificed by intracardiac perfusion at 60 days after the beginning of the experiment. The mandibles were removed for histologic and histometric analyses of the gingival and bone tissues, and radiographic analysis of the alveolar bone support and density. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA, Tuckey) at 5% and to the non-parametric test of Kruskal-Wallis. The mean percentage of alveolar bone support for the CG ( $60.5 \pm 2.22\%$ ) was similar to the CsALG ( $58.1 \pm 2.24\%$ ) and different to the CsAG ( $55.0 \pm 4.44\%$ ) and LG ( $54.8 \pm 3.11\%$ ) ( $p=0.0007$ ). Bone density and PA activity were not statistically different among groups ( $p=0.1776$ , and  $p=0.2806$ , respectively). The mean values for TRAP+ cells were not statistically different among experimental groups ( $p=0.3995$ ). The mean values of the periodontal ligament area for CG ( $0.29 \pm 0.03\text{mm}^2$ ) were similar to the CsAG ( $0.30 \pm 0.02\text{mm}^2$ ) and statistically different to the CsALG ( $0.43 \pm 0.17\text{mm}^2$ ) and to the LG ( $0.41 \pm 0.11\text{mm}^2$ ) ( $p=0.3994$ ). With regards to the total area of the gingival tissue, the mean values for the CsAG ( $0.088 \pm 0.033\text{mm}^2$ ) and LG ( $0.101 \pm 0.034\text{mm}^2$ ) were similar between each other and statistically different to the CG ( $0.053 \pm 0.020\text{mm}^2$ ) and CsALG ( $0.146 \pm 0.047\text{mm}^2$ ) ( $p=0.000001$ ). Regarding the proportion of connective tissue area to the total area, the mean value of the CG ( $28.60 \pm 8.64\%$ ) was similar to the CsAG ( $32.72 \pm 14.13\%$ ) and statistically different to the CsALG ( $38.50 \pm 10.98\%$ ) and to the LG ( $37.70 \pm 7.49\%$ ) ( $p=0.0093$ ). In relation to the proportion of the epithelial tissue area to the total area, the mean value for the CG ( $71.39 \pm 8.64\%$ ) was similar to the CsAG ( $67.27 \pm 14.13\%$ ) and different to the CsALG ( $61.49 \pm 10.98\%$ ) and LG ( $63.37 \pm 7.44\%$ ) ( $p=0.0142$ ). In the proportion of epithelial tissue area to the connective tissue area, the mean value for the CG ( $2.80 \pm 1.13$ ) was similar to the CsAG ( $2.18 \pm 1.32$ ) and different to the CsALG ( $1.89 \pm 1.17$ ) and LG ( $1.81 \pm 0.80$ ) ( $p=0.0334$ ). Based on these results it can be concluded that previous exposure to CsA did not significantly modify the development of periodontal disease induced in rats.

**Key-Words:** Cyclosporine A. Gingival Overgrowth. Alveolar bone loss. Animal studies. Osteoporosis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos Experimentais	45
Tabela 2 - Valores dos pesos corpóreos dos animais (mg)	61
Tabela 3 - Valores do SOP (%)	62
Tabela 4 - Valores da DR (Tons de Cinza)	63
Tabela 5 - Valores da Atividade da FA (U/L)	64
Tabela 6 - Valores de células TRAP+ (escore)	65
Tabela 7 - Valores da ALP (mm <sup>2</sup> )	66
Tabela 8 - Valores da ATTG (mm <sup>2</sup> )	67
Tabela 9 - Comparação dos valores da proporção AC/AT (%)	68
Tabela 10 - Comparação dos valores da proporção AE/AT (%)	69
Tabela 11 - Comparação dos valores da proporção AE/AC	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Administração da Ciclosporina A com agulha de gavagem	46
Figura 2 - Realização da anestesia no rato	47
Figura 3 - Ligadura inserida no primeiro molar inferior esquerdo	48
Figura 4 - Realização da perfusão cardíaca	49
Figura 5 - Realização da punção no plexo venoso abdominal	50
Figura 6 - Delimitação da área total que descreve a papila gengival (azul) e da área que compreende o tecido conjuntivo (verde) observadas em aumento de 40x	54
Figura 7 - Delimitação da área do ligamento periodontal (verde) observada em aumento de 100x	55
Figura 8 - Células produtoras de fosfatase ácida tartarato resistente, osteoclastos (setas). a) Lâmina fracamente marcada por células TRAP+ 200x; b) Lâmina moderadamente marcada por células TRAP+ 200x; c) Lâmina fortemente marcada por células TRAP+ 200x	56
Figura 9 - Realização da radiografia na mandíbula	57
Figura 10 - Mensuração do SOP	58
Figura 11 - Mensuração da DR	59
Figura 12 - Análise dos grupos na região da papila gengival	73
Figura 13 - Análise dos grupos sem ligadura	75
Figura 14 - Análise dos grupos com ligadura	76
Figura 15 - Análise do processo de remodelação óssea	77

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico dos pesos corpóreo dos animais	61
Gráfico 2 - Gráfico comparativo do SOP	63
Gráfico 3 - Gráfico comparativo da DR	64
Gráfico 4 - Gráfico comparativo da atividade da FA	65
Gráfico 5 - Gráfico comparativo de células TRAP+	66
Gráfico 6 - Gráfico comparativo da ALP	67
Gráfico 7 - Gráfico comparativo da ATTG	68
Gráfico 8 - Gráfico comparativo da proporção AC/AT	69
Gráfico 9 - Gráfico comparativo da proporção AE/AT	70
Gráfico 10 - Gráfico comparativo da proporção AE/AC	71

## LISTA DE ABREVIações

AC/AT	Área do tecido conjuntivo e área total
AE/AT	Área do epitélio e área total
AE/AC	Área do epitélio e área do conjuntivo
ALP	Área do ligamento periodontal
ATTG	Área total do tecido gengival
BCA <sup>TM</sup>	<i>protein Assay Kit- PIERCE</i>
CsA	Ciclosporina A
CsH	Ciclosporina H
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DR	Densidade Radiográfica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fosfatase alcalina
GC	Grupo controle
GCsA	Grupo Ciclosporina A
GCsAL	Grupo Ciclosporina A e ligadura
GL	Grupo Ligadura
HE	Hematoxilina e Eosina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
JEC	Junção esmalte – cimento
LPS	Lipopolissacarídeo
MMPs	Metaloproteinases da matriz extracelular

MMP-9	Metaloproteinase da matriz extracelular 9
MMP-2	Metaloproteinase da matriz extracelular 2
PMNs	Polimorfonucleares Neutrófilos
pH	Potencial hidrogeniônico
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa
SOP	Suporte ósseo periodontal
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	18
2.1 DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS	18
2.2 A CICLOSPORINA A	26
2.3 A CICLOSPORINA A E AS ALTERAÇÕES GENGIVAIS	31
2.4 A CICLOSPORINA A E AS ALTERAÇÕES ÓSSEAS	36
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b>	44
4.1 ANIMAIS	44
4.2 ADMINISTRAÇÃO DA CICLOSPORINA A	45
4.3 ANESTESIA	46
4.4 INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL	47
4.5 SACRIFÍCIO	48
4.6 ANÁLISE SANGÜÍNEA	49
<b>4.6.1 Atividade da fosfatase alcalina</b>	50
4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS	51
<b>4.7.1 Tecido gengival</b>	51
<b>4.7.2 Tecido ósseo</b>	52
4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO PERIODONTO	52
<b>4.8.1 Análise de área do tecido epitelial e tecido conjuntivo</b>	53
<b>4.8.2 Análise de área do ligamento periodontal (ALP)</b>	54
<b>4.8.3 Análise de células TRAP+</b>	55
4.9 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	56

<b>4.9.1 Suporte ósseo periodontal (SOP)</b>	57
<b>4.9.2 Densidade radiográfica (DR)</b>	58
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
<b>5 RESULTADOS</b>	61
5.1 PESO DOS ANIMAIS	61
5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	62
<b>5.2.1 Suporte ósseo periodontal</b>	62
<b>5.2.2 Densidade radiográfica</b>	63
5.3 ANÁLISE SANGÜÍNEA	64
<b>5.3.1 Fosfatase alcalina</b>	64
5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO PERIODONTO	65
<b>5.4.1 Células TRAP+</b>	65
5.5 ÁREA DO LIGAMENTO PERIODONTAL	66
5.6 ÁREA TOTAL DO TECIDO GENGIVAL	67
5.7 PROPORÇÃO ENTRE A ÁREA DO TECIDO CONJUNTIVO E A ÁREA TOTAL	68
5.8 PROPORÇÃO ENTRE A ÁREA DO TECIDO EPITELIAL E A ÁREA TOTAL	69
5.9 PROPORÇÃO ENTRE A ÁREA DO TECIDO EPITELIAL E CONJUNTIVO	70
5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA	72
<b>6 DISCUSSÃO</b>	78
<b>7 CONCLUSÃO</b>	85
<b>REFERÊNCIAS</b>	86
<b>ANEXO</b>	94

## 1 INTRODUÇÃO

A Ciclosporina A (CsA) é atualmente o medicamento de escolha utilizado para prevenir a rejeição de órgãos em pacientes transplantados. O fármaco é um potente imunossupressor indicado também no tratamento de doenças como o diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatóide, psoríase, malária, líquen plano erosivo, esclerose múltipla e colite ulcerativa. (BACH, 1994; BOLTCHI; REES; IACOPINO, 1999; ILGENLI; ATILLA; BAYLAS, 1999; KAHAN, 1989; KING et al., 1993).

O exato mecanismo de ação do fármaco ainda é desconhecido, contudo, foi verificado que a CsA pode interferir na maturação de células T e células B (HALLMON; ROSSMANN, 1999), através da inibição da produção de interleucina 2 (IL-2) em estágios precoces da ativação celular (BOLTCHI; REES; IACOPINO, 1999).

A eficácia da CsA no tratamento de algumas patologias resultou na sua popularização e no aumento da sua prescrição. Hassell e Hefti (1991) estimaram que cerca de um bilhão de pessoas se tornariam usuários crônicos do medicamento nesta década. Contudo, alguns efeitos colaterais têm sido associados com a utilização do medicamento, e com outras variáveis como: tempo de duração do tratamento (MONTEBUGNOLI; SERVIDIO; BERNARDI, 2000; MOVSOVITZ et al., 1988; SPOLIDÓRIO et al., 2001; SPOLIDÓRIO; SPOLIDÓRIO; HOLZHAUSEN, 2004), dosagem do medicamento (FU et al., 1995; MOVSOVITZ et al., 1988) e associações com outros fármacos (CHIU et al., 2001; JAMES et al., 2000b; SEYMOUR, 1991).

As manifestações adversas decorrentes do uso da CsA mais comumente descritas na literatura são: disfunção hepática, nefro – toxicidade, neuro – toxicidade e hipertensão. Ainda, um conjunto de alterações no metabolismo do tecido ósseo

manifestadas pelo desequilíbrio no *turnover* ósseo (FU et al., 2001; WADA et al., 2006), indução de osteopenia (KAWANA et al., 1996; MCDONALD; PRUUL, 1991) e patogênese da osteoporose (SPOLIDÓRIO et al., 2001, 2004), além das alterações observadas no tecido epitelial e tecido conjuntivo decorrentes do aumento gengival, podem representar um possível fator de risco para a doença periodontal (BIRRAUX et al., 2006; CHIN et al., 2006).

Uma série de hipóteses tem sido verificada com o intuito de explicar a patogênese do aumento gengival induzido pela CsA. Segundo Kataoka et al. (2003) a CsA é um agente imunossupressor que induz o aumento gengival através da redução na fagocitose do colágeno pelos fibroblastos. Contudo, o mecanismo de indução deste aumento ainda é desconhecido e algumas questões permanecem sem resposta (AYANOGLU; LESTY, 1999; MELLER et al., 2002).

Alterações teciduais decorrentes do uso da CsA vêm sendo observadas em modelos animais com o intuito de explicar o mecanismo de ação do fármaco. A possibilidade da indução de doença periodontal nesses modelos pode contribuir também para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença periodontal (GALVÃO et al., 2003; GONÇALVES et al., 2003; TAKATA et al., 1999). Ainda, a relação CsA e doença periodontal pode ser investigada nesses animais, sendo essa condição observada em seres humanos, em decorrência do número de pacientes submetidos a utilização do fármaco e da alta incidência de doença periodontal na população.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da indução de doença periodontal no tecido ósseo, tecido epitelial e tecido conjuntivo no periodonto de ratos previamente expostos à CsA.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

A indução da doença periodontal através do uso da ligadura consiste na inserção de um dispositivo que tem como finalidade promover irritação mecânica e aumento do número de bactérias através do acúmulo de biofilme supra e subgengival gerando uma resposta inflamatória prejudicial ao periodonto (GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002; GYORFI et al., 1994).

Modelos animais vêm sendo utilizados para a observação dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença periodontal induzida por ligadura. Algumas vantagens são atribuídas à utilização desses modelos, como a facilidade de manipulação dos animais, possibilidade de realização de desenho experimental para várias doenças, possibilidade do uso associado de fármacos e a própria indução da doença periodontal (GAU et al., 2005; PAGE; SCHROEDER, 1982; PRABHU; MEHTA, 2006).

Um animal bastante empregado no desenvolvimento de estudos experimentais com doença periodontal induzida é o rato. Segundo Kimura et al. (2000), este modelo é amplamente empregado em pesquisa e pode facilitar o entendimento do início e progressão da doença periodontal. Algumas metodologias são capazes de induzir doença periodontal nesses animais, sendo elas: manipulação dietética, inserção de ligaduras ao redor da região cervical dos molares (geralmente os primeiros molares superiores e inferiores), inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos (RODINI, 2005). De

acordo com Bentzen et al. (2005) a anatomia na região dos molares de ratos é muito semelhante a do homem.

Galvão et al. (2003) realizaram um estudo com o objetivo de descrever as características histológicas da doença periodontal induzida em ratos através de ligadura, associada ou não com dieta rica em sacarose. Vinte e quatro ratos Wistar com sessenta dias, pesando entre 144 e 170g foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo: Grupo A (Controle) – dieta convencional; Grupo B – ligadura no segundo molar superior e dieta convencional; Grupo C – dieta rica em sacarose; Grupo D – ligadura no segundo molar superior e dieta rica em sacarose. Os animais foram submetidos à anestesia geral para a realização do procedimento. A ligadura foi introduzida nos espaços proximais ao redor do dente, sendo estabilizada por dois nós na superfície palatal e mantidas por trinta dias. Após esse período, os animais foram sacrificados e as maxilas removidas para a realização do processamento histológico. Na análise histológica, foi verificado que todos os animais dos grupos A e C apresentaram o epitélio juncional com características de normalidade, quantidade normal de vasos sanguíneos e células do tecido conjuntivo, fibras do ligamento periodontal, crista óssea alveolar regular e padrão normal de células do ligamento periodontal. Nos animais dos grupos B e D houve a ruptura do epitélio juncional e migração apical, presença de células inflamatórias e vasos sanguíneos, perda de fibras supracristal e do ligamento periodontal, crista óssea alveolar irregular (reabsorção), ruptura do cemento e seqüestro ósseo. A gengiva dos animais com dieta rica em sacarose não foi diferente dos animais do grupo controle. Os autores concluíram que o uso da ligadura foi capaz de promover periodontite em ratos, independente da dieta. Ainda, a análise fatorial de correspondência mostrou ser uma

ferramenta adequada para avaliar as características histológicas da doença periodontal induzida.

Khur et al. (2004) avaliaram a destruição periodontal após a indução de doença periodontal em ratos através da utilização de ligadura durante um período de observação de sessenta dias. A movimentação fisiológica dos dentes e a sua influência sobre o efeito da ligadura também foi avaliado. Ainda, dois métodos para mensuração da perda óssea foi comparado pelos autores. Foram utilizados 35 ratos Sprague Dawley, machos, com aproximadamente quatro semanas de vida e divididos em cinco grupos: grupo A, ratos sem ligadura sacrificados no primeiro dia do experimento; grupo B, ratos sem ligadura sacrificados em sessenta dias; grupo C, ratos com ligadura inserida no primeiro dia e sacrificados no 15<sup>o</sup> dia; grupo D, ratos com ligadura inserida no primeiro dia e sacrificados no 30<sup>o</sup> dia e grupo E, ratos com ligadura inserida e sacrificados no 60<sup>o</sup> dia. As ligaduras foram inseridas no segundo molar superior, após anestesia dos animais. Os ratos foram sacrificados por decapitação e as maxilas preparadas para a realização da análise microscópica. A perda óssea foi determinada por meio de dois métodos distintos. A primeira análise considerou a distância entre a junção esmalte cimento (JEC) e a crista óssea em dez pontos na região vestibular e dez pontos na região palatina. O segundo método avaliou a área referente às raízes vestibular e palatina, considerando um total de seis áreas por maxila. Na comparação dos resultados, o grupo B apresentou uma perda óssea significativa em relação ao grupo A, sendo essa perda mais pronunciada na região vestibular, na análise da distância, e maior na região radicular do primeiro molar, na análise da área. Na comparação entre os grupos B e E, foi observada maior perda óssea no grupo E na análise da distância, entretanto, na análise de área, essa diferença não foi significativa. Ainda, a perda óssea induzida

pela ligadura foi bem evidente no grupo C quando comparado ao grupo A em ambas as análises. Uma estagnação no processo de perda óssea foi observada durante a indução da doença periodontal por um período de sessenta dias. Os autores concluíram que durante a indução da doença periodontal, os animais do grupo controle e os animais dos grupos experimentais, devem apresentar idade similar, para a possível observação das alterações fisiológicas e alterações determinadas pela indução da doença periodontal. Em relação à análise das duas técnicas descritas, os autores afirmaram que a perda óssea deve ser mensurada pela técnica da distância. Os autores verificaram ainda, que a indução da doença periodontal em ratos por meio de ligadura é limitada, sendo o período de observação relativamente curto, de 15 dias.

Bentzen et al. (2005) compararam dois métodos para a indução de doença periodontal em ratos: periodontite induzida por ligadura e injeção gengival de Lipopolissacarídeo (LPS). A perda óssea alveolar foi comparada através de análise morfométrica e radiográfica. Foram utilizados cem ratos MOL:SPRD, machos, pesando cerca de 337g. Uma avaliação periodontal prévia através da sondagem dos animais anestesiados foi realizada para excluir possíveis espécimes com alterações periodontais. A injeção de LPS foi realizada na papila interdental pelas faces vestibular e palatalina, entre o primeiro e segundo molar superior. As ligaduras foram divididas de modo randomizado em sete grupos: grupo A, injeção de solução salina (controle do grupo B), durante seis dias; grupo B, injeção de LPS, durante seis dias; grupo C, sem tratamento (controle dos grupos A e D) e sacrifício em uma semana; grupo D, indução de doença periodontal através de ligadura durante uma semana e posterior sacrifício; grupo E, sem tratamento (controle dos grupos F e G), durante quatro semanas; grupo F, indução de doença periodontal através de ligadura



durante quatro semanas e posterior sacrifício; grupo G, sem tratamento, ratos com tubo de PVC em gaiolas, durante quatro semanas e posterior sacrifício. Os animais dos grupos A e B foram sacrificados no sexto dia. Após o sacrifício dos animais, a perda óssea foi avaliada através da mensuração da distância entre a JEC e a crista óssea alveolar em 15 pontos para cada maxila. As medidas foram realizadas eletronicamente com fotografia digital obtida por microscopia. A análise radiográfica foi realizada através da digitalização das radiografias e mensuração através do software DP-Soft ver. 3.2. Foram consideradas medidas obtidas do ápice das raízes mesial e distal à cúspide mesial e distal do segundo molar superior. A distância entre o defeito ósseo interproximal e o ápice radicular também foi considerada na análise radiográfica. O suporte ósseo periodontal foi obtido através da análise radiográfica dessas duas medidas. Os resultados mostraram que a perda óssea entre os grupos A, B, C e E foi similar. Contudo, a perda óssea nos grupos D e F foi significativamente maior em relação aos grupos descritos anteriormente. Ainda, a perda óssea no grupo F foi superior a do grupo D. A perda óssea observada no grupo G foi similar ao grupo E. Por fim, a perda óssea no grupo A foi similar aos grupos B, C, e E. Os autores verificaram que a indução de doença periodontal através de ligadura por um período de quatro semanas, levou à uma destruição óssea significativa. Foi observado também que é possível induzir doença periodontal em ratos no período de uma semana através da utilização de ligadura. Ainda, esse processo apresentaria algumas vantagens como à diminuição do tempo e custo do estudo, além de possibilitar uma menor manipulação dos animais. Por fim, os autores concluíram que o método de indução de doença periodontal através da injeção gengival de LPS mostrou ser pouco confiável.

Rodini (2005) realizou um estudo para caracterizar o modelo experimental da doença periodontal induzida por ligadura em ratos, através de avaliação clínica e microscópica. Durante seu estudo, foi realizada a quantificação dos mastócitos e a presença de RNA mensageiro (RNAm) codificador das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases (MMPs) 2 e 9. Foram utilizados no estudo, 51 ratos Wistar, machos, com peso médio entre 70 à 100g. Os animais foram submetidos à inserção da ligadura nos primeiros molares inferiores do lado direito (grupo experimental), sendo o lado oposto utilizado como controle (grupo controle). O estudo foi realizado em três etapas: análise microscópica e morfológica do tecido dentário e tecido ósseo, análise microscópica e histoquímica das amostras gengivais e por fim, análise por meio de Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-PCR) das amostras gengivais. Os animais submetidos à análise microscópica e morfológica foram sacrificados nos períodos de um, três, sete, 14, 28, 42, e 56 dias após a inserção da ligadura, sendo um total de três animais por período. Para a realização da análise microscópica e histoquímica das amostras gengivais, o sacrifício dos animais foi realizado nos períodos de um, três, sete, 14 e trinta dias após a colocação da ligadura, com um total de três animais por período. O sacrifício dos animais para análise por RT-PCR seguiu o mesmo padrão do grupo submetido à análise microscópica e histoquímica das amostras gengivais. Durante a análise microscópica e morfológica do tecido dentário e tecido ósseo, foram avaliados parâmetros microscópicos quanto à junção dentogengival, ligamento periodontal, presença de reabsorção dentária e da crista óssea alveolar e a presença de biofilmes. Na análise morfológica das amostras gengivais, os mesmos parâmetros microscópicos citados anteriormente foram seguidos, com exceção da presença de reabsorção dentária e da crista óssea alveolar. Após análise

microscópica dos tecidos periodontais submetidos ao acúmulo progressivo de placa por meio da ligadura, foi observado variações morfológicas significantes entre os diferentes períodos de indução da doença periodontal. Observou-se a presença de polimorfonucleares (PMNs) nos tecidos afetados pela doença, principalmente nos estágios iniciais, e a expressão aumentada de RNAm para MMP-9 nos períodos de três e sete dias. Não foi observado aumento significativo na expressão de RNAm para MMP-2. A expressão de RNAm para iNOS também foi maior nos tecidos doentes em relação ao controle. O número de mastócitos ( $\text{mm}^2$ ) apresentou-se diminuído na doença periodontal com relação aos tecidos gengivais saudáveis. A autora concluiu que os neutrófilos podem ter grande participação na ativação da síntese de MMPs via produção de iNOS, nos estágios iniciais após indução da doença periodontal. Ainda, os produtos da degradação dos mastócitos não parecem ter importância no recrutamento dos PMNs. Por fim, segundo a autora, o presente estudo apresentou uma metodologia reprodutível de indução da doença periodontal inflamatória em ratos, mais sem a progressão para um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário que caracteriza a doença em humanos.

Semenoff et al. (2006) avaliaram em ratos com periodontite induzida, dois métodos distintos utilizados em análise histométrica: imagem digitalizada e retroprojeter de lâminas. Foram utilizados no estudo, oito ratos Wistar, machos, pesando entre 290 – 315g. Os animais foram anestesiados para a indução de doença periodontal através da inserção de ligadura ao redor do segundo molar superior direito. Após sessenta dias, os animais foram sacrificados, sendo as hemimaxilas do lado direito submetidas a processamento histológico e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). A análise histométrica considerou a distância entre a JEC na mesial do segundo molar e a fibra periodontal inserida. A distância entre a

JEC e a crista óssea alveolar também foi considerada. A mensuração das distâncias foi realizada de duas formas: avaliação das imagens por computador, através do Software ImageLab 2000 e avaliação das lâminas histológicas através de um retroprojetor de lâminas posicionado a uma distância de 60cm da tela. No resultado das análises histométricas, considerando a distância entre a JEC e a fibra periodontal inserida nas duas diferentes histometrias, não foi verificada diferença estatística. Na avaliação da distância entre a JEC e a crista óssea alveolar, não houve diferença significativa entre as médias obtidas com as duas histometrias. Os autores concluíram que as duas metodologias de avaliação histométrica podem fornecer similaridade nos resultados.

Fernandes et al. (2007) compararam dois métodos para detecção da altura óssea associada à inserção da ligadura em ratos. No presente estudo, foram utilizados dez ratos Wistar, machos, com sessenta dias de vida e pesando entre 250 e 350g. Os animais foram anestesiados para a inserção da ligadura no segundo molar superior esquerdo, sendo mantida durante trinta dias. Os dentes do lado oposto, sem ligadura, foram utilizados como controle do experimento. Os ratos foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. As maxilas dos animais foram removidas e seccionadas na região medial. Assim, as hemi-maxilas direitas e esquerdas de cinco ratos foram processadas para análise histológica. As hemi-maxilas dos outros cinco ratos foram submetidas à análise morfométrica. Durante a realização das análises histológica e morfométrica, foram obtidas imagens dos cortes histológicos e das hemi-maxilas dos animais por meio de fotografia digital. Uma escala calibrada também foi fotografada para a conversão das medidas. Um examinador cego e calibrado utilizou o software ImageTool<sup>®</sup> para obter três medidas lineares da crista óssea à JEC na região vestibular e palatina do segundo molar

superior. Os resultados mostraram que a utilização da ligadura resultou em uma considerável perda óssea alveolar na região vestibular e palatal, observada durante as análises morfométrica e histométrica. Em relação à comparação dessas duas análises, a região palatal dos dentes com e sem ligadura e a região vestibular dos dentes com ligadura, não apresentaram diferença estatística significativa entre os métodos. Os autores concluíram que as análises histométrica e morfométrica são capazes de detectar alterações na altura óssea em ratos com doença periodontal induzida por ligadura.

## 2.2 A CICLOSPORINA A

A descoberta da CsA na década de 1970, à partir da fermentação de produtos metabólicos das espécies de fungos *Tolypocladium inflatum Gams*, abriu um novo horizonte no tratamento de pacientes submetidos a transplantes de órgãos (HALLMON; ROSSMAN, 1999).

O sucesso da terapia com a CsA resultou na sua popularização e no aumento da sua indicação terapêutica. Hassel e Hefti (1991) estimaram que cerca de um bilhão de pessoas seriam usuários crônicos da CsA nesta década.

O fármaco é um potente imunossupressor que atua seletivamente nas células moduladoras da resposta imune, através de um mecanismo que inibe a produção de IL-2, que é responsável pelo desenvolvimento de sinais essenciais para a maturação das células T e B (BOLTCHI; REES; IACOPINO, 1999).

A CsA é o medicamento de escolha utilizada no controle da rejeição de

órgãos sólidos como o coração, pâncreas, intestino, fígado, rim e ainda em casos de transplante de medula óssea. Foi observado que o uso do fármaco em pacientes transplantados pode elevar a taxa de sucesso nos transplantes renais de 50% para 95% (HASSEL; HEFTI, 1991).

Os pacientes submetidos à cirurgia para transplantes renais, geralmente apresentam um quadro de hipertensão, sendo utilizados para o seu tratamento, medicamentos do grupo dos bloqueadores do canal de cálcio, como a Nefedipina (GIUSTINIANI; ROBUSTELLI; MARIENI, 1987; KHOORI et al., 2003).

Devido as suas características de medicamento imunossupressor seguro e com baixa toxicidade, a CsA pode ser indicada também no tratamento de numerosas alterações mediadas imunologicamente, como o diabete *mellitus* do tipo 1, artrite reumatóide, psoríase, doença de Crohn, pênfigo, malária, líquen plano erosivo, colite ulcerativa (BACH et al., 1994; BOLTCHI; REES; IACOPINO, 1999; ILGENLI; ATILLA; BAYLAS, 1999; KING et al., 1993).

A administração do fármaco pode ser realizada por via oral, intramuscular ou endovenosa, sendo necessária uma dose diária terapêutica de 10 à 20mg/kg para a manutenção da imunossupressão, quando administrada por via oral (BOLTCHI; REES; IACOPINO, 1999). A CsA é metabolizada no fígado, resultando em 14 produtos metabólicos, dos quais 90% são excretados pelas fezes e os 10% restantes, excretados pelos rins (SEYMOUR; JACOBS, 1992).

Apesar do sucesso observado no tratamento de pacientes transplantados com a utilização do medicamento, alguns efeitos adversos como nefro - toxicidade, disfunções hepáticas, distúrbios neurológicos e hipertensão são atribuídos ao uso da CsA (SEYMOUR; ELLIS; THOMASON, 2000). Ainda, o fármaco parece contribuir com a patogênese da osteoporose (SPOLIDÓRIO et al., 2001, 2004), atuar no

desequilíbrio do turnover ósseo (FU et al., 2001; WADA et al., 2006), induzir osteopenia (KAWANA et al., 1996; MCDONALD; PRUUL, 1991) e aumento gengival (ABDOLLAHI; RADFAR, 2003), sendo considerado um possível fator de risco para a doença periodontal (BIRRAUX et al., 2006; CHIN et al., 2006).

Os efeitos adversos associados ao fármaco são dependentes da dosagem do medicamento (FU et al., 1995), tempo de duração do tratamento (MONTEBUGNOLI; SERVIDIO; BERNARDI, 2000; SPOLIDÓRIO et al., 2001; SPOLIDÓRIO; SPOLIDÓRIO; HOLZHAUSEN, 2004) e associações com outros fármacos (CHIU et al., 2001; JAMES et al., 2000b; SEYMOUR, 1991). Contudo, a maioria desses efeitos adversos é reversível e não deixam seqüelas após a interrupção do uso (HALLMON; ROSSMANN, 1999).

Para Chiu et al. (2001) o aumento da hiperplasia gengival decorrente da associação da CsA com a Nefedipina, observado em seu estudo em ratos, está mais relacionado com outros fatores, como por exemplo o biofilme dental, do que a interação entre esses medicamentos. Montebugnoli, Servidio e Bernardi (2000) verificaram em pacientes usuários da CsA submetidos a transplante de coração, que o aumento gengival diminuiu espontaneamente com o passar do tempo, na maioria dos pacientes que realizaram um simples programa de controle do biofilme.

O aumento do volume gengival é uma manifestação clínica local relatada por diversos estudos descritos na literatura (CALNE et al., 1981; MARIANI, 1993; RATEITSCHAK-PLÜSS et al., 1983; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996) que interfere nas funções normais desenvolvidas na cavidade oral e prejudica a higiene do paciente, alterando a sua estética e auto estima (CHABRIA; WEINTRAUB; KILPATRIC, 2003; KING et al., 1993).

As características clínicas observadas nos pacientes com aumento gengival

são de um tecido denso, rosado, com aspecto lobular, sendo um processo localizado ou generalizado e geralmente assintomático (CARRANZA et al., 2004).

Segundo Rateitschak-Plüss et al. (1983), qualquer região da cavidade oral pode ser afetada pelo aumento gengival, principalmente a região vestibular dos dentes ântero-superiores e inferiores, na qual o crescimento é mais pronunciado. Barclay et al. (1992), verificaram em seu estudo que a prevalência da hiperplasia gengival induzida pela Ciclosporina ou Nefidepina pode variar entre 20% à 40%. Para Ramalho et al. (2003) a prevalência de hiperplasia gengival induzida pela CsA pode chegar à 85%, dependendo do critério utilizado no seu diagnóstico. Algumas variáveis como a concentração sérica de CsA, duração da terapia, métodos de avaliação do crescimento gengival, condição periodontal básica, idade dos pacientes, saúde geral do paciente, podem influenciar a determinação da prevalência do aumento gengival.

A extensão do crescimento gengival pode estar relacionada com alguns fatores, entre eles: nível de higiene oral do paciente (HALLMON; ROSSMANN, 1999; ROMITO et al., 2004), severidade da inflamação gengival (SEYMOUR; ELLIS; THOMASON, 2000), susceptibilidade genética (TRACKMAN; KANTARD, 2004). Porém, o impacto individual causado por cada fator, ainda não foi bem descrito na literatura (THOMASON et al., 1996).

Está comprovado que o uso da CsA e de outros fármacos como a Nefidepina, Fenitoína, Verapamil e Diltiazem estão frequentemente associados com alterações gengivais e podem induzir o crescimento gengival de maneira independente (BARAK; ENGELBERG; HISS, 1987; GIUSTINIANI; ROBUSTELLI; MARIENI, 1987; SEYMOUR, 1991; TORREZAN et al., 2005). King et al. (1993) afirmam que ainda não está comprovado que a associação da CsA com a nefidepina pode levar a um



aumento adicional no volume gengival. Entretanto, Khoori et al. (2003) verificaram em pacientes submetidos a transplante renal, que a associação da CsA com a nefidepina promoveu um aumento da severidade e incidência da hiperplasia gengival.

Diferentes terapias podem ser preconizadas no tratamento do aumento gengival induzido pela CsA (CAMARGO et al., 2001; ILGENLI; ATILLA; BAYLAS, 1999). De acordo com Mavrogiannis et al. (2006) uma variedade de métodos que vão desde a execução de um programa rigoroso de higiene oral, com o uso de agentes coadjuvantes químicos e antibióticos, até a indicação de procedimentos cirúrgicos como a gengivectomia, eletrocirurgia e retalhos cirúrgicos, podem ser utilizados no tratamento dos pacientes. Kantarci et al. (1999) avaliaram o efeito da terapia periodontal em pacientes com aumento gengival induzido pela CSA e verificaram que através da raspagem supra e subgengival houve redução de 30% no aumento gengival de 47% dos pacientes submetidos a esse tratamento.

A substituição da CsA por outro fármaco também pode ser considerada uma alternativa viável de tratamento. Ellis et al. (2004) verificaram que a prevalência e a gravidade do aumento gengival, foi menor em adultos transplantados submetidos a utilização do Tacrolimus em comparação à CsA. Ainda, de acordo com James et al. (2000a) a substituição da CsA por Tacrolimus em pacientes transplantados renais, provou ser uma estratégia efetiva na regressão do aumento gengival, entretanto, em nenhum paciente observado no estudo o aumento gengival regrediu completamente. Para Chabria, Weintraub e Kilpatric (2003) o Tacrolimus é um agente imunossupressor com menor potencial para o desenvolvimento de aumento gengival nos pacientes, contudo, a maioria dos estudos publicados até o momento apresenta limitação em relação ao tamanho da sua amostra.

Alterações no metabolismo ósseo associadas com a utilização da CsA vêm sendo investigada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Modelos animais constituem uma alternativa eficaz no estudo dessas alterações, que também podem ser observadas em animais com doença periodontal induzida. Fu et al. (1999) verificaram em seu experimento em ratos, que a ação da CsA no metabolismo do osso alveolar nesses animais é distinta. Os autores observaram um aumento da atividade de osteoclastos nos sítios periodontais dos ratos submetidos ao medicamento e diminuição na formação óssea nos sítios sinfisais. Ainda, Shen, Fu e Hsieh (2001) avaliaram em ratos a histomorfologia óssea de alvéolos dentais de animais submetidos a CsA, e verificaram que o medicamento possui ação inibitória no processo de formação óssea nos alvéolos dentais. Entretanto, Nassar et al. (2000) verificaram que a intensidade da perda óssea alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura, foi menor nos animais imunossuprimidos com a utilização da CsA.

Nassar, Nassar e Spolidório (2003) concluíram durante sua revisão da literatura, que as alterações no metabolismo do osso alveolar, decorrentes da ação da CsA no desenvolvimento da doença periodontal, permanece sem conclusão, tendo em vista que os resultados dos experimentos *in vivo* não são compatíveis com os resultados observados nos estudos *in vitro*.

### 2.3 A CICLOSPORINA A E AS ALTERAÇÕES GENGIVAIS

Fu et al. (1995) realizaram um estudo para avaliar a relação do aumento gengival induzido pelo uso da CsA com a dosagem da droga administrada em ratos.

Oitenta animais, pesando entre 150 e 250g, foram distribuídos de modo randomizado em quatro grupos. Os três primeiros grupos receberam a dose do medicamento nas seguintes proporções: 3mg/kg; 10mg/kg; 30mg/kg durante seis semanas, sendo o quarto grupo mantido como controle. Para avaliar as alterações gengivais, modelos de gesso da região anterior e inferior foram confeccionados em intervalos de duas semanas. Em seguida, os animais foram sacrificados para a realização da análise histológica dos tecidos. Nos grupos medicados com 10 e 30mg/kg, a gengiva vestibular foi bastante alterada e um exuberante tecido conjuntivo com vasos e infiltrado inflamatório foi observado. Os autores concluíram que existe uma relação entre a dosagem do medicamento e o aumento gengival em ratos.

Ayanoglou e Lesty (1999) propuseram investigar o mecanismo de indução do aumento gengival pela CsA. Dezesesseis ratos, com seis semanas de vida, foram divididos em grupo controle e grupo experimental, sendo oito animais para cada grupo. Os ratos do grupo experimental receberam dose diária de 30mg/kg de CsA via oral por gavagem. Após quatro, nove, 14 e 19 semanas, dois animais do grupo controle e dois animais do grupo experimental foram sacrificados através da perfusão cardíaca e suas mandíbulas foram removidas para o processamento histológico. Análises histomorfométricas foram realizadas na região vestibular, lingual e palatina da gengiva livre dos primeiros e segundos molares inferiores. Todos os animais do grupo controle e grupo experimental foram avaliados e divididos em três novos grupos, sendo: grupo controle, grupo CsA não reagente e CsA reagente, de acordo com o grau de envolvimento do aumento gengival. Os resultados mostraram que no grupo controle, as características estruturais da gengiva livre permaneceram idênticas aquelas descritas anteriormente. Após o uso

da CsA, foi observado aumento na gengiva livre em todos os ratos variando em número e grau de acordo com o animal. Os autores concluíram que as modificações induzidas pela CsA não estão limitadas apenas ao aumento gengival, sendo que este é resultado da vasodilatação, do aumento do volume da matriz extracelular e aumento da espessura do epitélio.

Spolidório et al. (2001) propuseram avaliar o aumento gengival em ratos tratados diariamente com 10mg/kg de CsA por sessenta dias e a sua regressão após a interrupção do tratamento. Quarenta ratos Wistar, pesando 50g, foram distribuídos de modo randomizado em oito grupos com cinco animais cada. Sete grupos foram tratados com doses diárias subcutâneas de 10mg/kg de CsA durante sessenta dias, sendo o grupo restante usado como controle. Após sessenta dias, todos os animais tratados com CsA apresentaram aumento gengival envolvendo todos os dentes. O grupo controle e um grupo experimental foram sacrificados após sessenta dias do início do experimento. Os demais grupos foram sacrificados cinco, dez, 15, trinta, sessenta e noventa dias após o tratamento ser interrompido. Análise histológica e histométrica foram realizadas na gengiva vestibular dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo. Microscopicamente, foi observado aumento do epitélio oral e da densidade do tecido conjuntivo. Houve redução progressiva no volume gengival associado à interrupção do tratamento, principalmente após noventa dias, no qual o volume gengival se apresentou similar ao controle. O volume dos fibroblastos, fibras colágenas, aumentou significativamente após sessenta dias e o volume de vasos diminuiu nesse período. Após noventa dias do término da medicação, a porcentagem dos fibroblastos e fibras colágenas permaneceu maior que o controle, mais sem diferença estatística entre eles. Os autores concluíram que

são indicados mais estudos experimentais e estudos *in vitro* para a compreensão do mecanismo que envolve a regressão do aumento gengival.

Meller et al. (2002) realizaram um estudo com o objetivo de desenvolver em camundongos, aumento gengival com características semelhantes às observadas nos estudos em humanos. Segundo os autores, este modelo apresentaria algumas vantagens como facilidade de manipulação, possibilidade do uso de medicamentos experimentais. Três diferentes raças de camundongos, CBA, F1 e Balb/c, com idade entre três e quatro meses, foram utilizadas no experimento. Os animais receberam diferentes concentrações de CsA, 10mg/kg, 25mg/kg e 40 mg/kg, cinco vezes por semana via peritônio. Após à primeira semana o grau de alteração gengival foi avaliado diariamente. Os animais foram sacrificados no intervalo de duas semanas e o tecido gengival foi removido para análise microscópica. Os resultados mostraram que todas as raças desenvolveram hiperplasia gengival, independente dos fatores genéticos. Todas as diferentes concentrações produziram alterações na coloração da gengiva após seis semanas de tratamento. Mudanças no volume gengival foram observadas após quatro semanas em 30% dos animais submetidos a 10mg/kg e 25mg/kg de CsA, e em todos os animais medicados com 40mg/kg do fármaco. Após oito semanas, todos os animais manifestaram hiperplasia gengival independente da dosagem utilizada. As alterações foram mais evidentes na região lingual-vestibular de molares inferiores e incisivos superiores. O exame histológico mostrou um infiltrado inflamatório composto por células mononucleares, hipertrofia de células epiteliais e aumento na espessura do epitélio, aumento na espessura do tecido conjuntivo, aumento na vascularização e edema. Os autores concluíram que é possível desenvolver em camundongos o crescimento gengival induzido pela CsA, com características semelhantes às observadas em humanos.

Kataoka et al. (2003) avaliaram em seu estudo a função do receptor  $\alpha 2\beta 1$  integrina na indução do crescimento gengival pelo uso da CsA. Os autores isolaram fibroblastos da gengiva de ratos fed e uma dieta em pó contendo Ciclosporina e outra dieta sem a droga, foram administradas por trinta dias. Uma análise da citometria do fluído foi realizada para mensurar a fagocitose do colágeno e a função da integrina  $\alpha 2$  no fibroblasto. Ainda, todos os RNAs foram isolados dos fibroblastos e a reação polimérica de quebra da cadeia de transcriptase reversa foi empregada para investigar o nível de RNAm da integrina  $\alpha 2$ . Os resultados do ensaio *in vitro* da fagocitose do colágeno, mostraram que o grupo tratado com CsA e o grupo controle obtiveram uma média de 13,5% e 36,1% de células fagocitárias respectivamente. O grupo tratado com CsA apresentou 28% menos manifestação da integrina  $\alpha 2$  que o grupo controle. A manifestação do RNAm de integrina  $\alpha 2$  no grupo tratado com CsA foi aparentemente menor que no grupo controle, entretanto, a manifestação de RNAm do integrina  $\beta 1$  não foi afetada. De acordo com os resultados obtidos, o autor sugere que um fator etiológico associado ao crescimento gengival, pode inibir a fagocitose do colágeno através da redução da manifestação da integrina  $\alpha 2$  nos fibroblastos.

Spolidório, Spolidório e Holzhausen (2004) propuseram em seu estudo avaliar os efeitos do uso prolongado da CsA no tecido gengival e osso alveolar de ratos. Oitenta animais mantidos em condições similares e pesando cerca de 50g, foram distribuídos de modo randomizado em oito grupos com dez ratos cada. Quatro grupos foram tratados com CsA na dose diária de 10mg/kg durante os períodos de sessenta, 120, 180 e 240 dias, sendo os quatro grupos restantes mantidos como controle. Passado o período experimental, os animais foram sacrificados para a realização da análise histométrica. Medidas lineares da espessura e altura do

epitélio oral e espessura do tecido conjuntivo foram realizadas no primeiro molar inferior esquerdo e direito. Os resultados mostraram um aumento no volume do epitélio e tecido conjuntivo nos grupos que receberam a CsA durante sessenta e 120 dias em relação aos grupos controle e redução no volume desses tecidos após a utilização do medicamento por 180 e 240 dias. Os autores puderam concluir que, as modificações no periodonto de ratos associados com a utilização da CsA, possuem relação com o tempo de administração do medicamento.

#### 2.4 A CICLOSPORINA A E AS ALTERAÇÕES ÓSSEAS

Rucinski, Liu e Epstein (1994) compararam em ratos o efeito da CsA e Ciclosporina H (CsH) nos marcadores do metabolismo ósseo e na histomorfometria óssea. Os autores se propuseram a avaliar a hipótese de que a CsH não produz alterações no metabolismo ósseo, semelhantes à CsA, e que este efeito seria independente das alterações nas citocinas. Foram utilizados trinta ratos com dez semanas de vida e pesando aproximadamente 300g. Os animais foram divididos em três grupos, sendo: Grupo A – Controle; Grupo B – CsA 15mg/kg; Grupo C – CsH 15mg/Kg. O medicamento foi administrado por via oral, por meio de agulha de gavagem, durante vinte e oito dias. Em seguida, os animais foram submetidos à coleta de sangue nos dias zero, sete, 14 e 28 e sacrificados após esse período através de perfusão cardíaca, mediante a utilização de anestesia. Para a realização da análise histológica, os ratos tiveram a tíbia removida e dissecada, sendo dividida em diáfise e metáfise. A metáfise foi seccionada em três partes e corada com

diferentes técnicas. Durante análise histomorfométrica, os seguintes parâmetros foram considerados: volume ósseo, número de osteoclasto, porcentagem do volume da matriz osteóide, índice de aposição mineral, índice de formação mineral. Os resultados não apontaram nenhuma mudança significativa no cálcio em nenhum grupo. No grupo submetido à administração da CsA, houve um aumento significativo no índice de aposição mineral, decréscimo no volume ósseo, aumento no número de osteoclasto. O grupo submetido à utilização da CsH não mostrou diferença significativa na histomorfometria óssea comparado ao grupo Controle. Ainda, o volume da matriz osteóide não mudou em nenhum grupo. Os autores puderam concluir que a CsA foi capaz de acelerar o processo de remodelação óssea, levando a uma perda óssea em ratos imunossuprimidos. Assim, o estudo enfatiza a importância das citocinas no metabolismo do tecido ósseo. A CsH não produziu alterações significantes no metabolismo ósseo.

Kawana et al. (1996) realizaram um estudo para avaliar os efeitos da CsA na remodelação óssea de ratos, através da utilização de marcadores bioquímicos e análise histomorfométrica. Doze ratos com oito semanas de vida foram divididos, de modo randomizado, em dois grupos: Grupo A – Controle (6) e Grupo B – CsA 15mg/Kg. Os animais foram pesados e submetidos à coleta de sangue no sétimo e 28<sup>o</sup> dia. A coleta do sangue foi realizada para possibilitar a análise da osteocalcina, e ainda, foi realizada a coleta da urina dos ratos. Os animais foram anestesiados e sacrificados no 28<sup>o</sup> dia para a remoção e dissecação da tíbia para a realização da análise histomorfométrica. Após análise bioquímica, os resultados mostraram que houve diferença significativa maior nos níveis de piridinolina no Grupo B em relação ao Grupo Controle. Não houve diferença significativa no nível de osteocalcina nos dias sétimo e 28<sup>o</sup> dia entre o Grupo A e Grupo B. O resultado da análise



histomorfométrica mostrou que o volume do osso trabecular dos ratos tratados com CsA foi significativamente menor que o Grupo Controle. O volume osteóide dos ratos tratados com CsA também foi menor que o Grupo Controle, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a administração da CsA por quatro semanas induziu osteopenia nos ratos devido a um desequilíbrio no *turnover* ósseo caracterizado pelo excesso de reabsorção e menor formação óssea.

Shen, Fu e Hsieh (2001) avaliaram por meio de análise histológica os efeitos da CsA no osso alveolar e o processo de formação da matriz osteóide ao redor do segundo molar superior de ratos, na tentativa de elucidar o possível mecanismo de alteração do osso alveolar induzido pelo medicamento. Foram utilizados vinte ratos com 25 semanas, selecionados randomizadamente e divididos em grupo Controle e grupo CsA. Os animais do grupo CsA receberam doses diárias de 15mg/kg. No final de duas e quatro semanas, os animais foram sacrificados para avaliação histopatológica e histométrica. Na análise histométrica, o volume do osso alveolar, o volume da medula óssea, a área superficial do osso alveolar, o volume da matriz osteóide, a área da superfície alveolar pelo volume, a espessura da matriz osteóide e a superfície de formação óssea foram avaliadas. Os resultados mostraram que houve um declínio do volume ósseo ao redor do molar no grupo submetido à CsA em relação ao grupo Controle. Foi observado aumento no volume da medula e osteopenia nos animais tratados com a droga. O volume da matriz osteóide foi significativamente afetado pela terapia com a CsA. Os autores concluíram que houve um efeito inibitório na formação do osso alveolar associado ao uso da CsA.

Gonçalves et al. (2003) investigaram a influência da CsA e da sua associação com a Nefidepina na perda óssea causada por periodontite induzida em ratos.

Foram utilizados 24 ratos Wistar, pesando entre 300 e 400g, distribuídos randomizadamente em um dos seguintes grupos terapêuticos: Grupo A – solução salina (controle); Grupo B – CsA 10mg/kg; Grupo C – Nefidepina 50 mg/kg e Grupo D – CsA 10mg/kg e Nefidepina 50mg/kg. Todos os animais receberam ligadura para indução da doença periodontal em um dos primeiros molares inferiores, sendo o dente contralateral mantido como controle. Os grupos foram submetidos diariamente a injeções subcutâneas das substâncias e após 25 dias do tratamento, os animais foram sacrificados. As mandíbulas foram removidas para realização do processamento histológico e o volume da perda óssea na região de furca foi determinado histometricamente. Clinicamente foi observado aumento de volume gengival nos animais dos Grupos B, C e D em relação ao Grupo A (controle) e ainda, em relação aos dentes com e sem ligadura, o aumento do volume gengival foi mais significativo nos dentes com ligadura. Durante a análise histométrica, foi observada uma grande área de tecido conjuntivo na região inter-radicular como resultado da perda óssea na região de furca. Após análise intragrupo, uma grande perda óssea foi observada nos dentes com ligadura em relação aos dentes sem ligadura (controle). Contudo, na análise intergrupos, a perda óssea nos dentes com ligadura nos grupos experimentais não foi estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a administração da CsA, associada ou não à Nefidepina, pode não influenciar a perda óssea na periodontite induzida por ligadura em ratos.

Nassar et al. (2004) avaliaram o efeito da CsA no osso alveolar de ratos com periodontite induzida, através de análise radiográfica, histológica e análise do soro. Vinte e quatro animais, pesando aproximadamente 100g, foram divididos randomizadamente em quatro grupos, sendo: Grupo A – Controle; Grupo B – Ligadura no primeiro molar inferior; Grupo C – Ligadura no primeiro molar inferior e

CsA 10mg/kg; Grupo D – CsA 10mg/kg. Após trinta dias, os animais foram sacrificados e os níveis de cálcio e fosfatase alcalina foram mensurados em todos os grupos. Durante análise radiográfica, a distância da crista do osso alveolar a JEC foi medida na superfície mesial dos primeiros molares inferiores. Na análise histológica, o volume de osteoclastos, osso alveolar, medula óssea e a relação da superfície óssea saudável e superfície com erosão, foram obtidos da região mesial do osso alveolar. Os resultados mostraram um significativo decréscimo do nível de cálcio em todos os grupos que receberam CsA. Nenhuma mudança significativa foi observada no nível de fosfatase alcalina. No Grupo C, houve diminuição no volume do osso alveolar, aumento no volume de osteoclastos, diminuição da medula óssea e da relação superfície óssea saudável e superfície com erosão, na superfície mesial do primeiro molar inferior. O exame radiográfico mostrou que a utilização exclusiva da CsA diminuiu a perda óssea alveolar na superfície mesial dos primeiros molares inferiores. Os autores concluíram que a CsA em níveis de imunossupressão pode causar um desequilíbrio na homeostasia do osso alveolar em ratos. Na presença de processo inflamatório, a inibição do sistema imune pela CsA pode diminuir a perda óssea inicial causada pela doença periodontal.

Spolidório, Spolidório e Holzhausen (2004) propuseram um estudo para avaliar os efeitos do uso prolongado da CsA no osso alveolar e no tecido gengival de ratos. Oitenta animais mantidos em condições similares e pesando cerca de 50g, foram distribuídos de modo randomizado em oito grupos com dez ratos cada. Quatro grupos foram tratados com CsA na dose diária de 10mg/kg durante os períodos de sessenta, 120, 180 e 240 dias, sendo os quatro grupos restantes mantidos como controle. Passado o período experimental, os animais foram sacrificados e os níveis de cálcio e fosfatase alcalina no soro foram avaliados. O volume do osso alveolar e

de osteoclastos foi mensurado através de análise histológica. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa no nível de cálcio nos grupos submetidos ao medicamento. Contudo, todos os grupos experimentais apresentaram aumento nos níveis da fosfatase alcalina no soro. Houve diminuição no volume do osso alveolar em relação aos grupos controle nos períodos de sessenta, 120 e 180 dias de uso da CsA. Após 240 dias, o volume ósseo aumentou ficando similar ao grupo controle. O volume de osteoclastos foi maior durante sessenta e 120 dias em relação ao controle e diminuiu após 180 e 240 dias em relação aos períodos experimentais iniciais (sessenta e 120 dias). Os autores puderam concluir que, as modificações no periodonto de ratos associados com a utilização da CsA, possuem relação com o tempo de administração do medicamento.

Wada et al. (2006) avaliaram o mecanismo da indução de osteoporose pelo uso da CsA em ratos e os efeitos do medicamento no metabolismo ósseo dos animais. Oitenta ratos *germ free* com 15 dias de vida foram divididos em 16 grupos de cinco animais. Os ratos foram submetidos a uma dieta de 50mg/kg de CsA pelos primeiros dez dias e 200mg/kg até o fim do experimento. Os animais foram sacrificados no oitavo, 16<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia após o início do experimento. Os animais destinados ao controle do experimento receberam a mesma dieta. Os animais tiveram a tíbia removida para a realização de análise através de imagem computadorizada e análise histológica. Os parâmetros considerados foram o volume ósseo por volume de tecido, espessura das trabéculas e separação das trabéculas ósseas. Na análise histológica foi considerado o número de osteoclasto por superfície óssea, número de osteoblasto por superfície óssea, volume ósseo pelo volume de tecido. Foi realizada coleta do plasma sanguíneo para análise bioquímica.

O volume ósseo pelo volume de tecido nos ratos tratados com a CsA foi significativamente menor em comparação aos animais do controle após 16 dias. TB / Sp foi significativamente maior nos animais medicados com a CsA em relação aos ratos do controle do experimento após 16 e trinta dias. Os resultados indicam que a CsA induziu a reabsorção do trabeculado ósseo na tíbia dos ratos após 16 dias. Durante análise histológica, os resultados mostraram que após o 16<sup>o</sup> dia, a perda do trabeculado ósseo nos animais medicados com a CsA foi mais evidente que nos animais do controle. O volume ósseo pelo volume do tecido nos ratos medicados foi significativamente menor se comparado com os animais do controle após 16 dias.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da indução de doença periodontal no metabolismo dos tecidos ósseo, tecido epitelial e tecido conjuntivo, no periodonto de ratos previamente expostos à Ciclosporina A.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados no presente estudo quarenta ratos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar), machos com 12 semanas de vida e peso aproximado de 300g. Os animais foram pesados diariamente e avaliados em relação ao seu estado de saúde. O trabalho foi realizado de acordo com as normas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNITAU (Registro CEEA/UNITAU nº 0019/06) (Anexo A). Todos os animais foram mantidos em condições similares, com temperatura ambiente controlada, em gaiolas com cinco ratos, sendo os mesmos alimentados com água e ração *ad libitum*, fornecido pelo biotério do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté. Os ratos foram inicialmente divididos de modo randomizado em quatro grupos (n=10): grupo Controle (GC), ratos sem ligadura e sem medicação; grupo Ciclosporina A (GCsA), administração de 10mg/kg de CsA durante sessenta dias à partir do início do experimento; grupo Ciclosporina A – Ligadura (GCsAL), inserção da ligadura após trinta dias do início do experimento e administração de 10mg/kg de CsA à partir do início do estudo, durante sessenta dias; grupo Ligadura (GL), inserção da ligadura após trinta dias do início do experimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos Experimentais

Grupos	N	Medicação (Dia Zero)	Ligadura (Dia 30)
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 ADMINISTRAÇÃO DA CICLOSPORINA A

A Ciclosporina A foi administrada diariamente, via oral, através de agulha de gavagem (Figura 1), durante o período de sessenta dias a partir do início do experimento. Os animais dos grupos GCsA e GCsAL receberam doses de 2ml de solução de Ciclosporina A (Sandimmun, Novartis, Brasil) diluída em água destilada na concentração de 1,25mg/ml considerando a dosagem de 10mg/kg de peso do animal.

Os animais dos grupos GC e GL não foram submetidos a nenhum medicamento administrado como placebo, contudo, foram manipulados diariamente por todo o período de administração da CsA para gerar uma situação similar de estresse.





Figura 1 - Administração da CsA com agulha de gavagem

#### 4.3 ANESTESIA

A solução anestésica foi composta de Cloridrato de Xilazina (Virbaxil<sup>®</sup>, Virbac do Brazil Ind. e Com. Ltda, São Paulo, Brazil) como relaxante muscular e Ketamina base (Francotar<sup>®</sup>, Virbac do Brazil Ind e Com. Ltda, São Paulo, Brazil) como anestésico geral, na proporção de 1: 0,5ml utilizando 0,1ml para cada 100g de peso do animal (RICARDO, 2002). Os animais foram anestesiados no momento da indução da doença periodontal (GCsAL e GL) e no momento do sacrifício (GC ; GCsA ; GCsAL e GL). A anestesia foi realizada via intramuscular na parte interna da coxa dos animais (Figura 2).



Figura 2 - Realização da anestesia no rato

#### 4.4 INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

Após trinta dias do início do experimento, os animais dos Grupos GL e GCsAL foram novamente pesados e anestesiados.

A indução da doença periodontal foi realizada por meio da inserção de uma ligadura, que constitui um fio de linha de algodão da marca corrente, nº10 (Coats Corrente Ltda, São Paulo, Brazil). A ligadura foi atada no lado mesial, mantendo-se subgingival nas faces distal, lingual e vestibular do primeiro molar inferior esquerdo, sendo mantida por um período de trinta dias após a sua colocação (Figura 3).

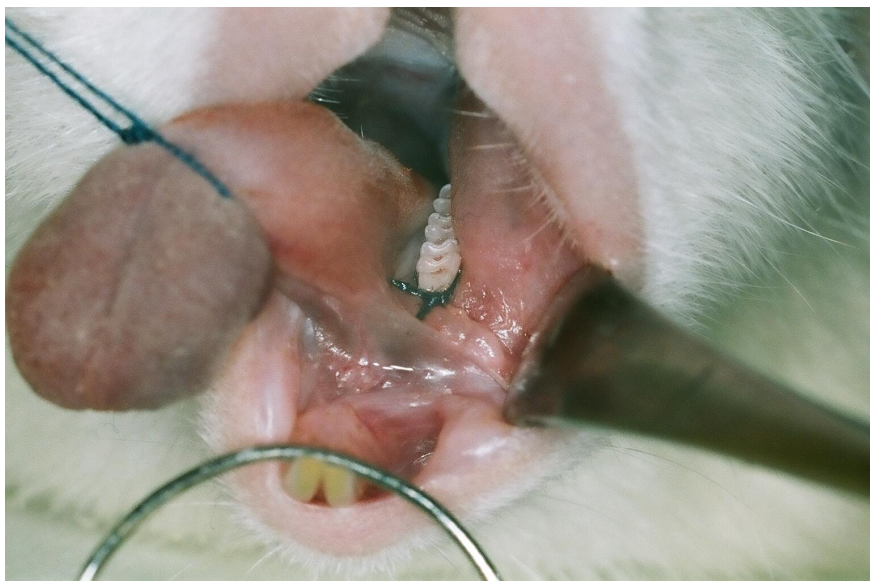


Figura 3 - Ligadura inserida no primeiro molar inferior esquerdo

#### 4.5 SACRIFÍCIO

Passados sessenta dias do início do experimento, os ratos dos grupos GC, GCsA, GCsAL e GL foram mais uma vez pesados e anestesiados. Em seguida, a morte dos animais foi realizada pela técnica da perfusão cardíaca, através da injeção de solução de formalina a 4% para possibilitar a fixação dos tecidos (Figura 4). Nesse momento, foi realizada a coleta de sangue e a remoção da gengiva de todos os animais para a realização da análise histológica do tecido epitelial e tecido conjuntivo e análise sanguínea. As mandíbulas de todos os ratos foram removidas e dissecadas para a realização da análise radiográfica e histológica do tecido ósseo.

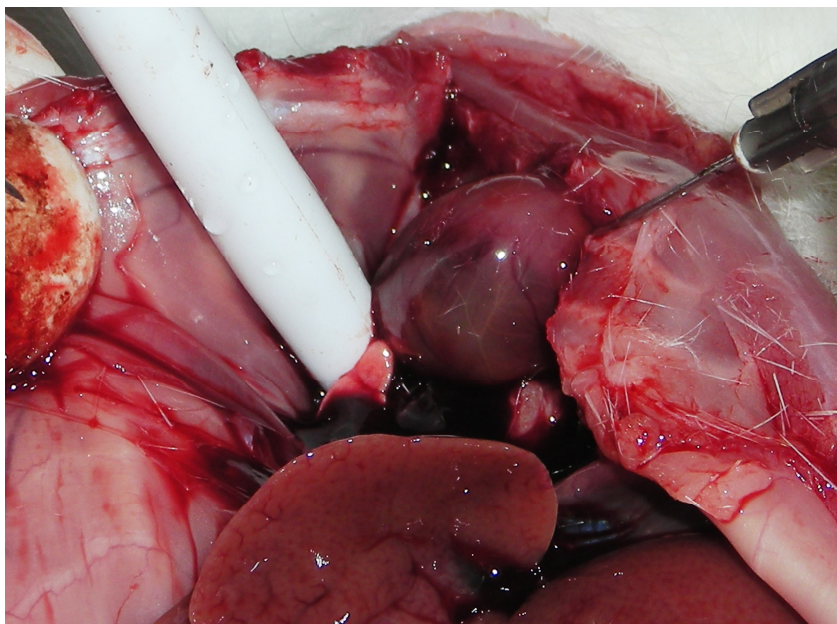


Figura 4 - Realização da perfusão cardíaca

#### 4.6 ANÁLISE SANGÜÍNEA

Para a realização da análise sangüínea, foram coletados dos animais cerca de 4-5ml de sangue obtido diretamente da punção do plexo venoso abdominal com tubos capilares heparinizados, no momento do sacrifício (Figura 5). A amostra do sangue foi centrifugada na velocidade de 3.000rpm durante cinco minutos. Em seguida, a amostra foi armazenada à  $-70^{\circ}\text{C}$  para a avaliação da atividade da fosfatase alcalina no soro.



Figura 5 - Realização da punção no plexo venoso abdominal

#### 4.6.1 Atividade da fosfatase alcalina

Para avaliar a atividade da fosfatase alcalina (FA), primeiramente foi dosada a quantidade de proteína total da amostra através do BCA<sup>TM</sup> (*protein Assay Kit-PIERCE*), conforme instruções do fabricante. Para a dosagem da FA foi utilizado o método cinético (Kit LaborLab) que contém um tampão reativo com solução de dietanolamina 1,25mmol/L com pH de 10,2 à 25°C, reativo substrato, solução de p-nitrofenilfosfato de sódio 50mmol/L. A leitura foi realizada através de um espectrofotômetro a 405nm, zerado contra água deionizada em Absorbância, em uma cuba mantida a 37°C. Após homogeneização, aguardou-se um minuto de

incubação para determinar a absorbância inicial. Após exatos um, dois e três minutos foram anotadas as médias das respectivas absorbâncias.

#### 4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS

O preparo das amostras foi realizado no Laboratório de Histologia do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté.

##### **4.7.1 Tecido gengival**

A gengiva da face vestibular do primeiro molar inferior esquerdo foi removida com o auxílio de lâminas de bisturi (nº15C). Em seguida, as amostras foram mantidas em formol a 4% e posteriormente incluídas em parafina para o processamento histológico. As peças cirúrgicas foram incluídas com plano de corte no sentido transversal e foram obtidos cinco cortes semi-seriados de 5µm por bloco. As lâminas foram coradas com HE e montadas para análise histológica e histomorfométrica do tecido epitelial e tecido conjuntivo.

#### **4.7.2 Tecido ósseo**

Após o sacrifício dos animais, as mandíbulas foram removidas e preparadas para análise radiográfica e análise histológica. As amostras foram primeiramente radiografadas e posteriormente descalcificadas em solução neutra de EDTA 10% por trinta dias, até serem consideradas próprias para a microtomia, pelo teste de penetração da agulha. Em seguida, as peças cirúrgicas foram lavadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina com a face lingual voltada para o plano de corte. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5µm no sentido méso-distal e as lâminas foram preparadas e coradas com o corante Tricrômico de Mallory para avaliação do tecido ósseo na bifurcação.

#### **4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO PERIODONTO**

Para a realização das análises histológica e histomorfométrica do tecido gengival, tecido conjuntivo e tecido ósseo, as lâminas histológicas foram fotografadas com máquina fotográfica digital Cyber Shot (Sony Brasil, Ltda) interligada ao microscópio óptico Carl Zeiss (Carl Zeiss do Brasil Ltda), sendo utilizado o programa de captura de imagens Axiolab. Durante a digitalização das imagens, o examinador padronizou a intensidade da luz do microscópio óptico e a

altura do condensador. As imagens foram avaliadas em duplicata por um examinador previamente calibrado que desconhecia o conteúdo das lâminas. O nível de concordância foi de 0,73. Foram obtidos valores médios para cada grupo experimental, sendo as análises realizadas com intervalo de uma semana entre elas.

#### **4.8.1 Análise de área do tecido epitelial e tecido conjuntivo**

A análise histomorfométrica da área total do tecido epitelial e do tecido conjuntivo foi realizada pelo software de leitura de imagens, Image Tool for Windows versão 2.0, de domínio público.

Primeiramente, a área total do fragmento que descreve a papila gengival foi delimitada para o programa informar o valor em mm<sup>2</sup>. Em seguida, a mesma ferramenta disponibilizada pelo software foi utilizada para delimitar a área do tecido conjuntivo. A partir dessas duas medidas, o valor da área ocupada pelo epitélio e o percentual de cada tecido foi calculado. As lâminas coradas com HE foram observadas em aumento de 100x (Figura 6).



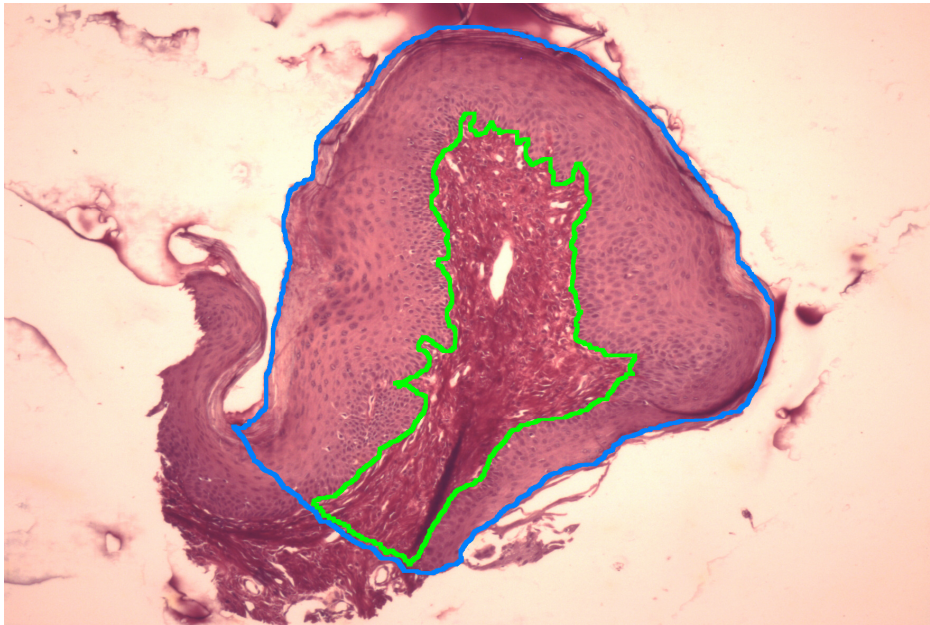


Figura 6 - Delimitação da área total que descreve a papila gengival (azul) e da área que compreende o tecido conjuntivo (verde) observadas em aumento de 40x

#### **4.8.2 Análise de área do ligamento periodontal (ALP)**

A área que compreende o teto da bifurcação do primeiro molar inferior esquerdo, seguindo 5mm pelas vertentes radiculares, e terminando na crista óssea do septo inter-radicular foi mensurada por meio do software de leitura de imagens, Image Tool for Windows versão 2.0. As lâminas foram coradas com o corante Tricrômico de Mallory e observadas em aumento de 100x (Figura 7).

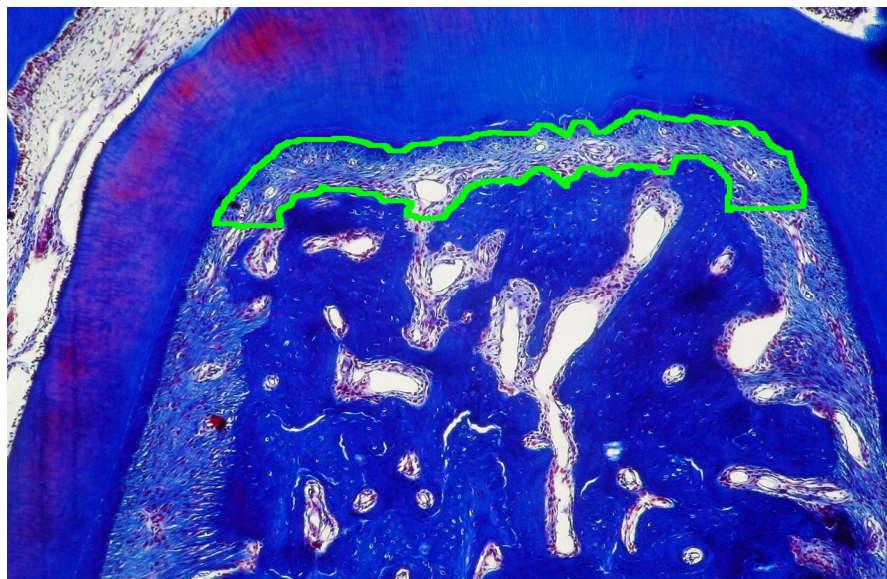


Figura 7 - Delimitação da área do ligamento periodontal (verde) observada em aumento de 100x

#### 4.8.3 Análise de células TRAP+

As lâminas coradas com o Kit Acid Phosphatase Leukocyte (Sigma - Aldrich), foram analisadas segundo a marcação positiva para células produtoras de fosfatase ácida tartarato resistente, coradas em púrpura por campo observado através do software ImageLab 2000, visualizadas no aumento de 200x. As lâminas consideradas fracamente marcadas por células TRAP+ receberam escore 1, as moderadamente marcadas receberam escore 2 e as fortemente marcadas receberam escore 3 (Figura 8).

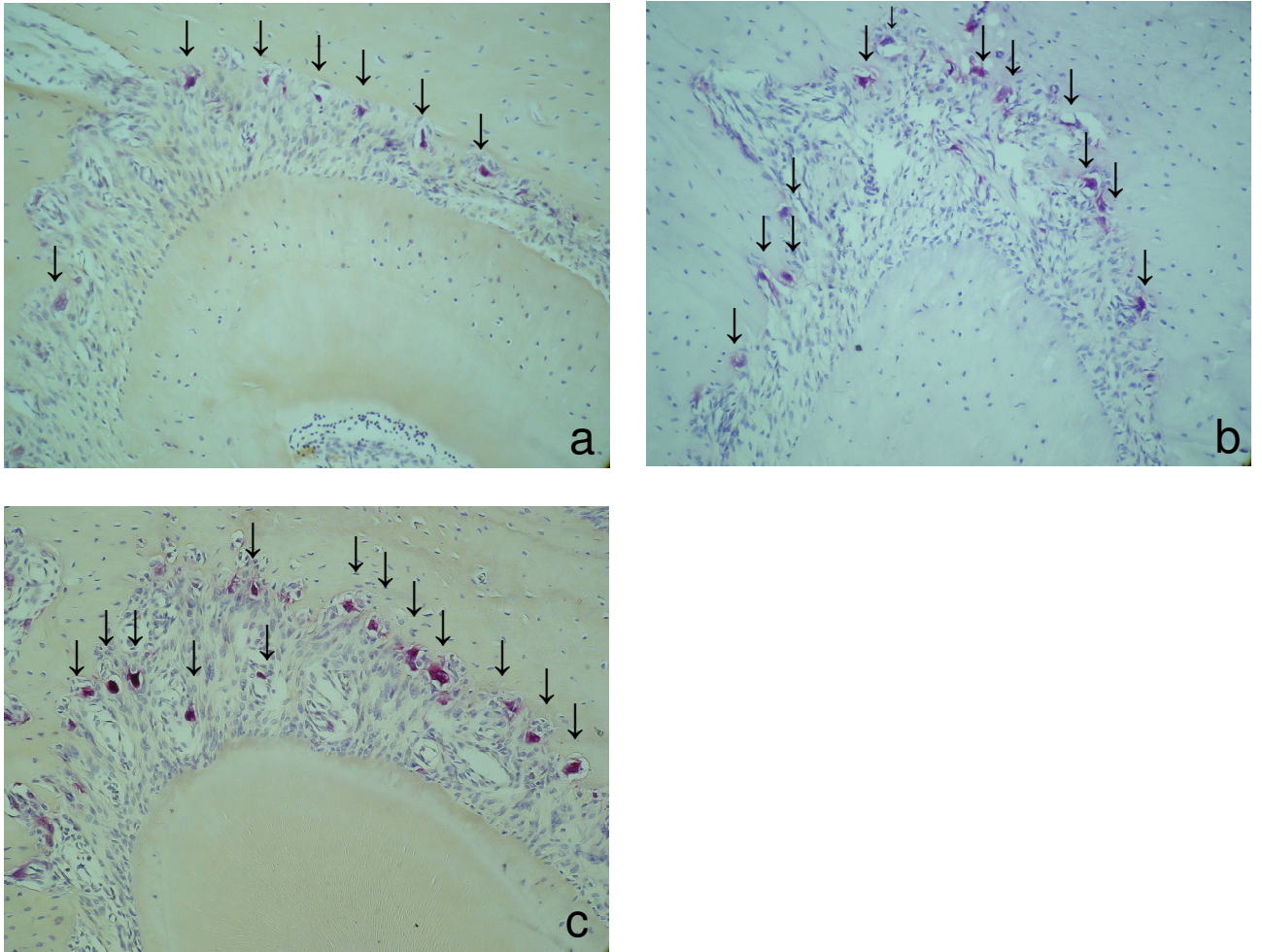


Figura 8 – Células produtoras de fosfatase ácida tartarato resistente, osteoclastos (setas): a) Lâmina fracamente marcada por células TRAP+ 200x; b) Lâmina moderadamente marcada por células TRAP+ 200x; c) Lâmina fortemente marcada por células TRAP+ 200x

#### 4.9 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As mandíbulas foram submetidas à análise radiográfica utilizando o Sistema de imagem Radiográfica intra-oral Digital RVG ® (RADIOVISIOGRAPHY – Trophy Radiology Inc. – Marietta / USA), o qual emprega Dispositivos de Carga Acoplada (sensor – CCD) para captura direta das imagens. O sensor foi exposto a 65KV e

7 $\mu$ A, com distância fonte-sensor de 30cm. As tomadas radiográficas foram realizadas utilizando um aparelho de raios x digital Gendex 765DC® (Gendex, Dentisply, Internacional, USA), com o tempo de exposição de 0,08 segundos (Figura 9).



Figura 9 - Realização da radiografia na mandíbula

#### 4.9.1 Suporte ósseo periodontal (SOP)

Foram fixados pontos para a mensuração do SOP. Os pontos representavam a porção mais coronária da cúspide dental, a ponta da crista óssea ou defeito ósseo e o ápice radicular. Esses pontos foram transportados como medidas lineares de

acordo com Klausen, Evans e Sfintescu (1989). O cálculo teve como resultado um valor percentual expresso pela proporção entre a segunda e a primeira medida multiplicado por cem. A primeira medida corresponde à distância entre a porção mais coronária da cúspide dental até a ponta da crista óssea ou defeito ósseo e a segunda medida a distância entre a ponta da crista óssea ou defeito ósseo até o ápice radicular. Na análise do SOP, o Software Image Tool 2.0 foi utilizado por um único examinador calibrado, que avaliou em duplicata o conteúdo das imagens, sem conhecer a identificação das imagens. Foram obtidos valores médios por imagem e por grupo (Figura 10).

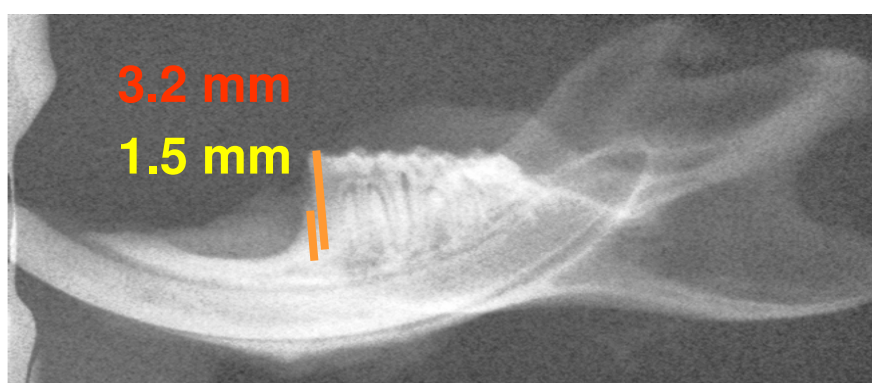


Figura 10 - Mensuração do SOP

#### **4.9.2 Densidade radiográfica (DR)**

A densidade radiográfica (DR) foi avaliada por meio do software Image tool versão 2.0. Foi desenhado um polígono regular na região periapical da raiz mediana,

entre as raízes mesial e distal, do primeiro molar inferior. A densidade radiográfica foi quantificada por meio da mensuração dos tons de cinza realizada pelo programa. A análise foi realizada em duplicata por um examinador calibrado, que desconhecia o conteúdo das imagens. Foram obtidos valores médios por imagem e por grupo (Figura 11).

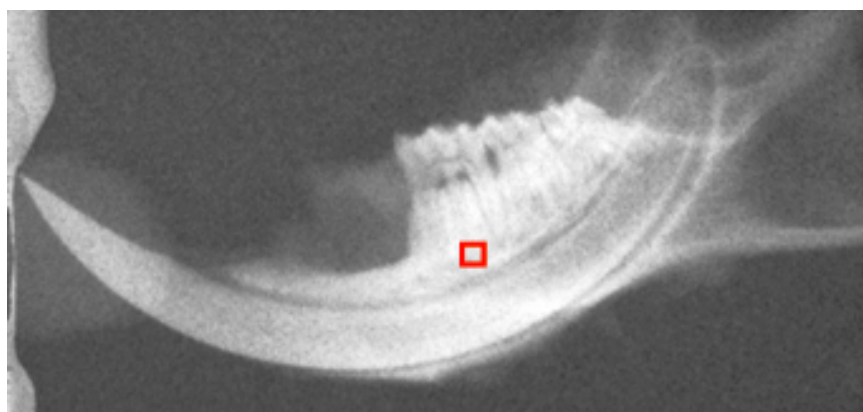


Figura 11 - Mensuração da DR

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos durante o experimento foram analisados quanto à normalidade da distribuição dos dados (Kolmogorov-Smirnov). Em seguida, os valores médios obtidos por grupo experimental foram submetidos à análise de variância (ANOVA e Kruskal - Wallis). Quando observadas diferenças estatísticas significativas na análise paramétrica ( $p < 0,05$ ), foi realizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Para todas as análises, foi adotado o nível de significância de 5%.

Os valores da proporção AC/AT, AE/AT, ambas do tecido gengival, TRAP e FA, foram submetidos à análise de variância (Kruskal – Wallis).

Os valores de SOP e DR (análise radiográfica), ATTG e AC/AE, ambas do tecido gengival, ALP e peso corpóreo dos animais, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação múltipla de Tukey.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PESO DOS ANIMAIS

Os valores médios dos pesos corpóreo dos animais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), não sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 2 e Gráfico 1).

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

Grupos (n = 10)	Dia 0 Média ± DP	Dia 30 Média ± DP	Dia 60 Média ± DP	Relação entre Grupos
GC	268.2±17.66	366.10±21.26	413.40±31.12	A
GCsA	279.2±25.10	356.60±31.25	406.80±31.16	A
GCsAL	281.2±30.02	368.61±25.97	411.76±44.96	A
GL	274.6±15.55	373.73±21.26	416.40±36.75	A
<i>p</i>	0.328	0.233	0.861	

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

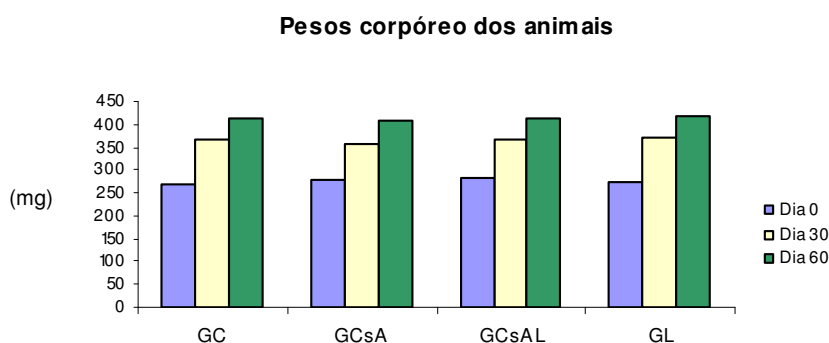


Gráfico 1 – Gráfico dos pesos corpóreo dos animais (mg) por grupo experimental



## 5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

### 5.2.1 Suporte ósseo periodontal

Os valores médios do SOP foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 3). Após teste de comparação múltipla de Tukey, verificou-se que GC e GCsAL, GCsA e GL, foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e GC e GCsA, GC e GL, GCsA e GCsAL, GCsAL e GL, foram diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 2).

Tabela 3 - Valores do SOP (%)

	N	Média $\pm$ DP	Relação entre Grupos
GC	10	60.5 $\pm$ 2.22	B
GCsA	10	55.0 $\pm$ 4.44	A
GCsAL	10	58.1 $\pm$ 2.24	B
GL	10	54.8 $\pm$ 3.11	A
<i>p</i>		0.1776	

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

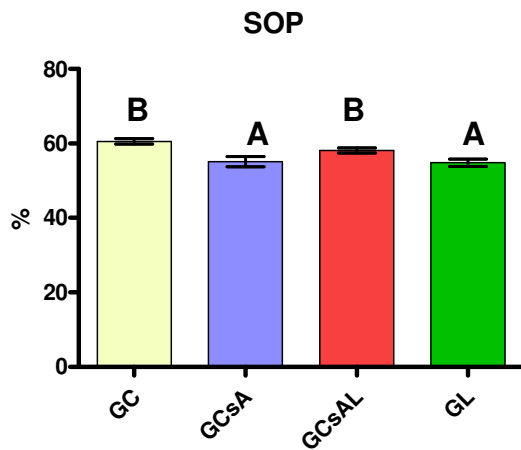


Gráfico 2 – Gráfico comparativo do SOP (%) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

### 5.2.2 Densidade radiográfica

Os valores médios da DR submetidos à análise de variância (ANOVA) não apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 4 e Gráfico 3).

Tabela 4 - Valores da DR (Tons de Cinza)

	N	Média ± DP	Relação entre Grupos
GC	10	234 ± 5.51	A
GCsA	10	239 ± 5.35	A
GCsAL	10	237 ± 5.15	A
GL	10	239 ± 4.97	A
<i>p</i>		0.1776	

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

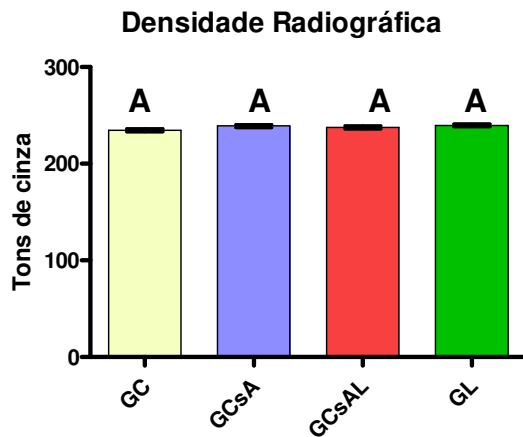


Gráfico 3 – Gráfico comparativo da DR (Tons de cinza) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

### 5.3 ANÁLISE SANGÜÍNEA

#### 5.3.1 Fosfatase alcalina

Os valores médios da atividade da FA foram submetidos à análise de variância (ANOVA), não sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 5 e Gráfico 4).

Tabela 5 - Valores da Atividade da FA (U/L)

	N	Média ± DP	Relação entre Grupos
GC	9	165.3 ± 22.58	A
GCsA	9	130.4 ± 19.93	A
GCsAL	9	131.1 ± 23.86	A
GL	9	173.2 ± 8.921	A
<i>P</i>		0.2806	

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

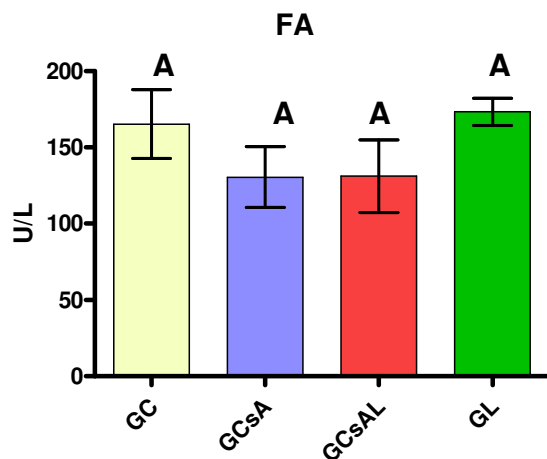


Gráfico 4 – Gráfico comparativo da atividade da FA (U/L) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

## 5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO PERIODONTO

### 5.4.1 Células TRAP+

Os valores médios de células TRAP+ por grupo foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Tabela 6 e Gráfico 5).

Tabela 6 - Valores de células TRAP+ (escore)

	N	Média ± DP	Relação entre Grupos
GC	9	1.40 ± 0.89	A
GCsA	9	1.75 ± 0.88	A
GCsAL	9	2.10 ± 0.73	A
GL	9	1.87 ± 0.83	A
<i>P</i>		0.3995	

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

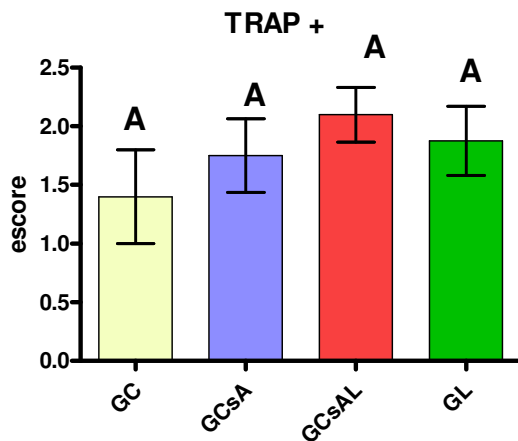


Gráfico 5 – Gráfico comparativo de células TRAP+ (escore) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

## 5.5 ÁREA DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Os valores médios da ALP junto ao teto da bifurcação radicular foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e como resultado desta análise foi observado diferença estatística significativa (Tabela 7). Após a comparação múltipla de Tukey observou-se que GC e GCsA, GCsAL e GL, foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e que GC e GCsAL, GC e GL, GCsA e GL, GCsA e GCsAL, foram diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 6).

Tabela 7 - Valores da ALP ( $\text{mm}^2$ )

	N	Média $\pm$ DP	Relação entre Grupos
GC	9	0.29 $\pm$ 0.03	A
GCsA	10	0.30 $\pm$ 0.02	A
GCsAL	9	0.43 $\pm$ 0.17	B
GL	9	0.41 $\pm$ 0.11	B
<i>P</i>		0.03994	

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

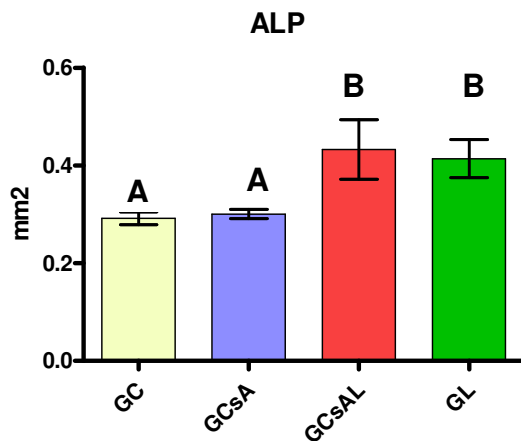


Gráfico 6 – Gráfico comparativo da ALP (mm<sup>2</sup>) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

## 5.6 ÁREA TOTAL DO TECIDO GENGIVAL (ATTG)

Os valores médios da ATTG foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e foi observada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Tabela 8). Os grupos GCsA e GL foram, semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e que GC e GCsA, GC e GCsAL, GC e GL, foram diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7).

Tabela 8 - Valores da ATTG (mm<sup>2</sup>)

	N	Média ± DP	Relação entre Grupos
GC	5	0.053 ± 0.020	A
GCsA	5	0.088 ± 0.033	B
GCsAL	5	0.146 ± 0.047	C
GL	5	0.101 ± 0.034	B
<i>P</i>		0.000001	

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

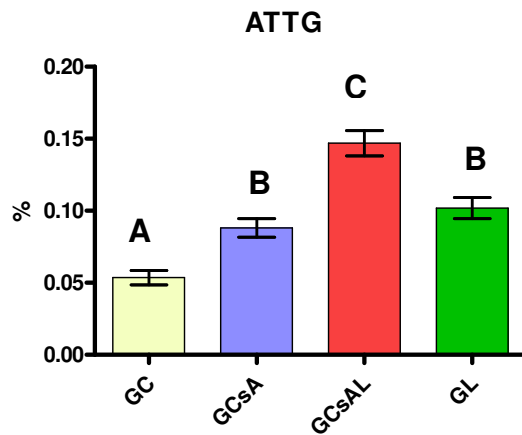


Gráfico 7 – Gráfico comparativo da ATTG (%) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

## 5.7 PROPORÇÃO ENTRE A ÁREA DO TECIDO CONJUNTIVO E A ÁREA TOTAL (AC/AT)

Os valores médios da proporção entre a AC/AT foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e foi observada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Tabela 9). O grupo GCsA foi semelhante a todos os grupos ( $p > 0,05$ ) e o grupo GC foi estatisticamente diferente de GCsAL e GL ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 8).

Tabela 9 - Comparação dos valores da proporção AC/AT (%)

	N	Média ± DP	Relação entre Grupos
GC	5	28.60 ± 8.64	B
GCsA	5	32.72 ± 14.13	AB
GCsAL	5	38.50 ± 10.98	A
GL	4	37.70 ± 7.49	A
<i>p</i>		0.0093	

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

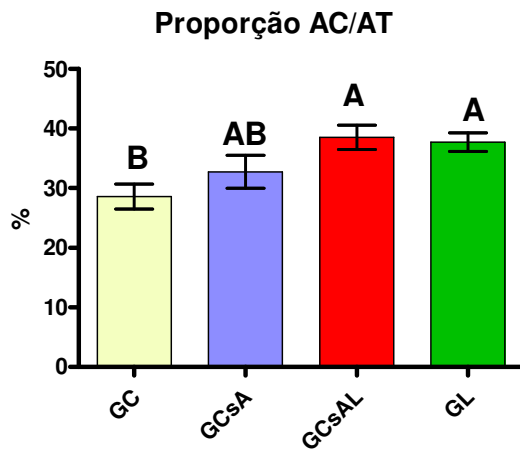


Gráfico 8 – Gráfico comparativo da proporção AC/AT (%) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

## 5.8 PROPORÇÃO ENTRE A ÁREA DO TECIDO EPITELIAL E A ÁREA TOTAL (AE/AT)

Os valores médios da proporção entre a AE/AT foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e foi observada diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Tabela 10). O grupo GCsA foi semelhante a todos os grupos ( $p > 0,05$ ) e o GC foi diferente de GCsAL e GL ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 9).

Tabela 10 - Comparação dos valores da proporção AE/AT (%)

	N	Média	Relação entre Grupos
GC	5	71.39 ± 8.64	B
GCsA	5	67.27 ± 14.13	AB
GCsAL	5	61.49 ± 10.98	A
GL	4	63.37 ± 7.44	A
<i>P</i>		0.0142	

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



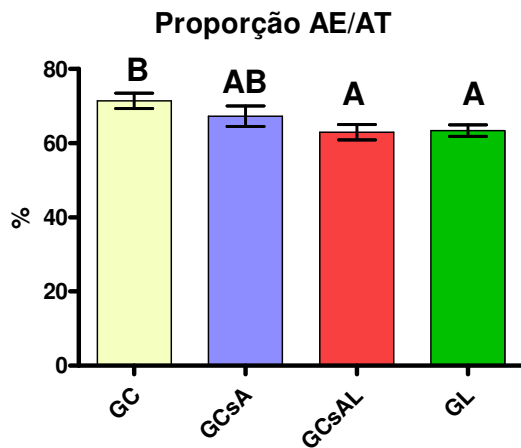


Gráfico 9 – Gráfico comparativo da proporção AE/AT (%) por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

## 5.9 PROPORÇÃO ENTRE A ÁREA DO TECIDO EPITELIAL E CONJUNTIVO (AE/AC)

Os valores médios da proporção entre a AE/AC apresentaram diferença estatística significativa após análise de variância (ANOVA) (Tabela 11). Após o teste de comparação múltipla de Tukey, verificou-se que o GCsA foi similar a todos os grupos ( $p > 0,05$ ) e o GC foi diferente do GCsAL e GL ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 10).

	N	Média	Relação entre Grupos
GC	5	2.80 ± 1.13	B
GCsA	5	2.18 ± 1.32	AB
GCsAL	5	1.89 ± 1.17	A
GL	4	1.81 ± 0.80	A
<i>P</i>		0.0334	

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

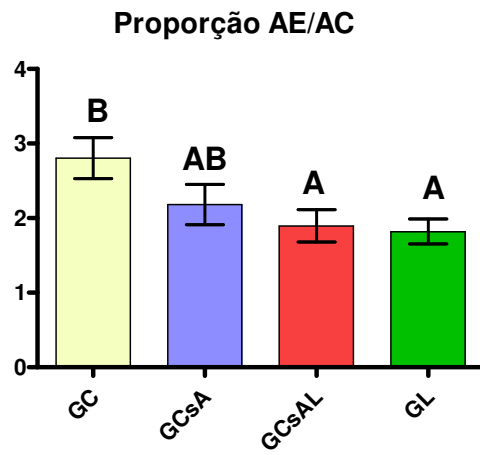


Gráfico 10 – Gráfico comparativo da proporção AE/AC por grupo experimental, letras iguais representam ausência de diferença estatística

## 5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico no qual foram avaliados fragmentos de mandíbula na região do processo alveolar em que estão implantados os molares inferiores. Os cortes foram realizados no sentido méso-distal de forma que, após o desgaste da raiz mediana, ficasse evidente a bifurcação do primeiro molar inferior.

O periodonto de proteção apresentava tecido epitelial com diferentes espessuras em relação à sua localização, sendo mais espesso na porção externa da papila gengival, diminuindo de espessura na porção do sulco gengival e retilíneo e com poucas camadas na porção do epitélio juncional. Este tecido apresentava-se estratificado e queratinizado ocupando a maior parte da papila gengival. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresentava-se levemente infiltrado por células mononucleares e na porção mais profunda da papila gengival, apresentava-se mais fibroso e menos celular, sendo permeado por fibroblastos em diferentes morfologias representando diferentes níveis de atividade de síntese colágena. Estas características sofriam pouca alteração quando analisadas em cortes de espécimes expostos à CsA sem a indução de doença periodontal. Nos animais nos quais foi inserida a ligadura, independentemente da presença de CsA foi observado aumento no infiltrado inflamatório sub epitelial e o tecido conjuntivo apresentava-se menos organizado e intensamente infiltrado por células mononucleares (Figura 12).

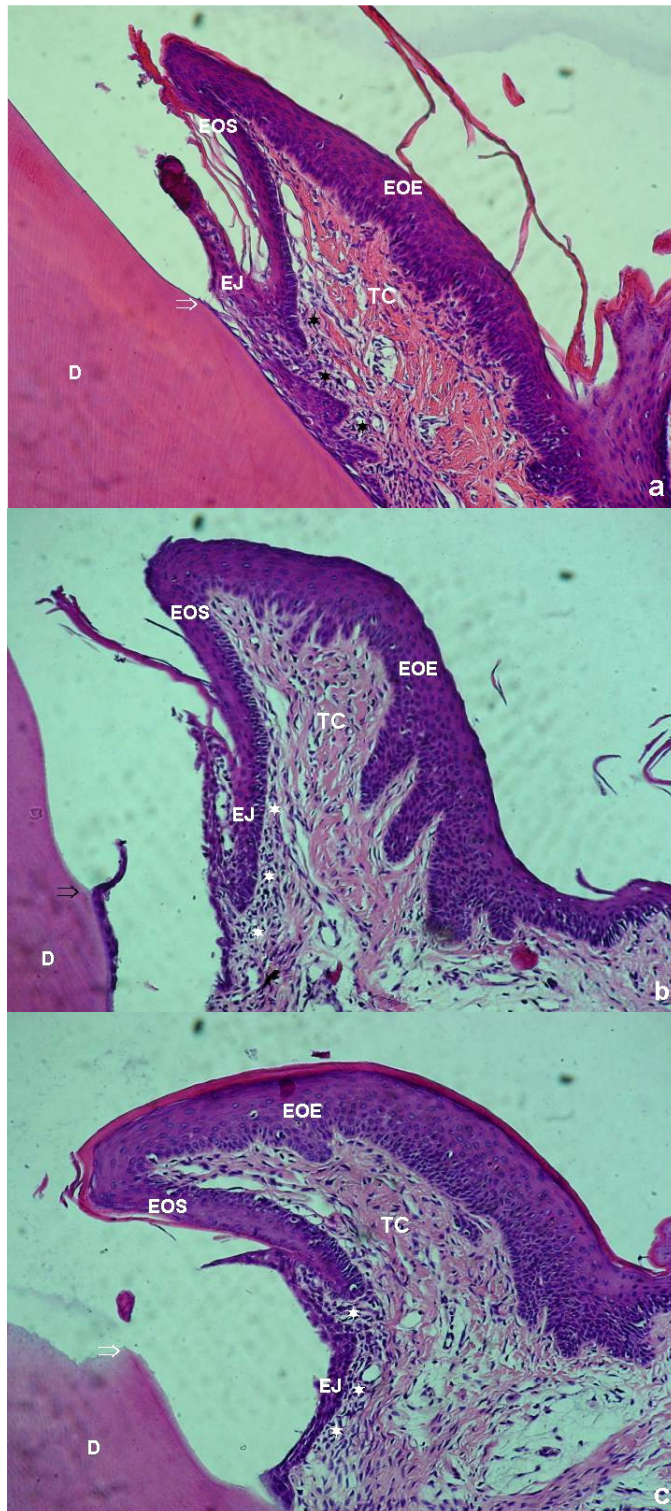


Figura 12 - Análise dos grupos na região da papila gengival

Aspectos histológicos da papila gengival apresentando alterações na proporção conjuntivo-epitélio nas diferentes condições experimentais comparadas ao controle. A) Grupo controle; b) Grupo CsA; c) Grupo CsAL. H-E 200x. D: dentina, EOE: epitélio oral externo, EOS: epitélio oral do sulco, EJ: epitélio juncional, TC: tecido conjuntivo, ⇒: junção cimento-esmalte, ★ infiltrado inflamatório

Em todos os cortes pode ser visto o processo alveolar com suas vertentes na face mesial do primeiro molar, o septo interradicular e o septo interdental. Nos cortes de animais de GC e GCsA o tecido ósseo observado na região de bifurcação apresentava-se compacto e mantendo uma relação de uniformidade em relação ao teto da bifurcação e ao espaço ocupado pelo ligamento periodontal. O tecido ósseo apresentava-se com aspecto ondulado característico de áreas com intensa atividade de remodelação óssea evidenciadas pelo grande número de linhas reversas observadas (Figura 13). Na região da bifurcação radicular dos espécimes nos quais foi induzida doença periodontal observava-se que parte da bifurcação era preenchida por tecido conjuntivo intensamente infiltrado por células mononucleares e em alguns espécimes pode ser observada presença de epitélio junto ao teto da bifurcação, caracterizando a perda de inserção conjuntiva (Figura 14). Nestes espécimes pode ser observada intensa atividade de reabsorção óssea caracterizada pela presença de lacunas de Howship preenchidas por osteoclastos ou ainda por pré-osteoclastos mononucleares ainda não fusionados junto à crista óssea no septo interradicular, bem como a atividade de remodelação óssea caracterizada pela presença de linhas reversas (Figura 15).

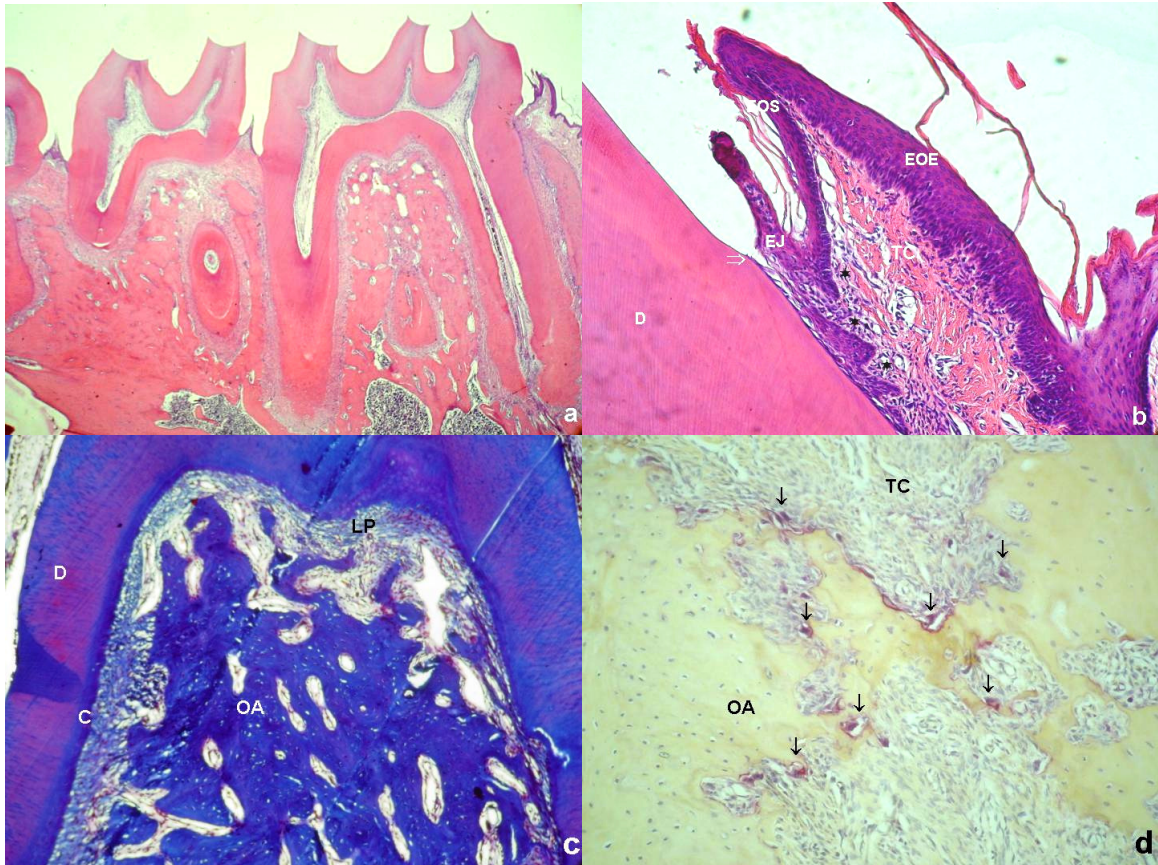


Figura 13 - Análise dos grupos sem ligadura

Aspectos histológicos dos espécimes de grupos sem indução da doença periodontal. a) Grupo controle H-E 25x. b) Papila gengival H-E 200x. c) Área de bifurcação radicular Mallory 100x. d) Marcação de células TRAP+ 200x. D: dentina, EOE: epitélio oral externo, EOS: epitélio oral do sulco, EJ: epitélio juncional, TC: tecido conjuntivo,  $\Rightarrow$ : junção cimento-esmalte, \* infiltrado inflamatório, AO: osso alveolar, C: cimento, TC: tecido conjuntivo,  $\downarrow$ : células TRAP+

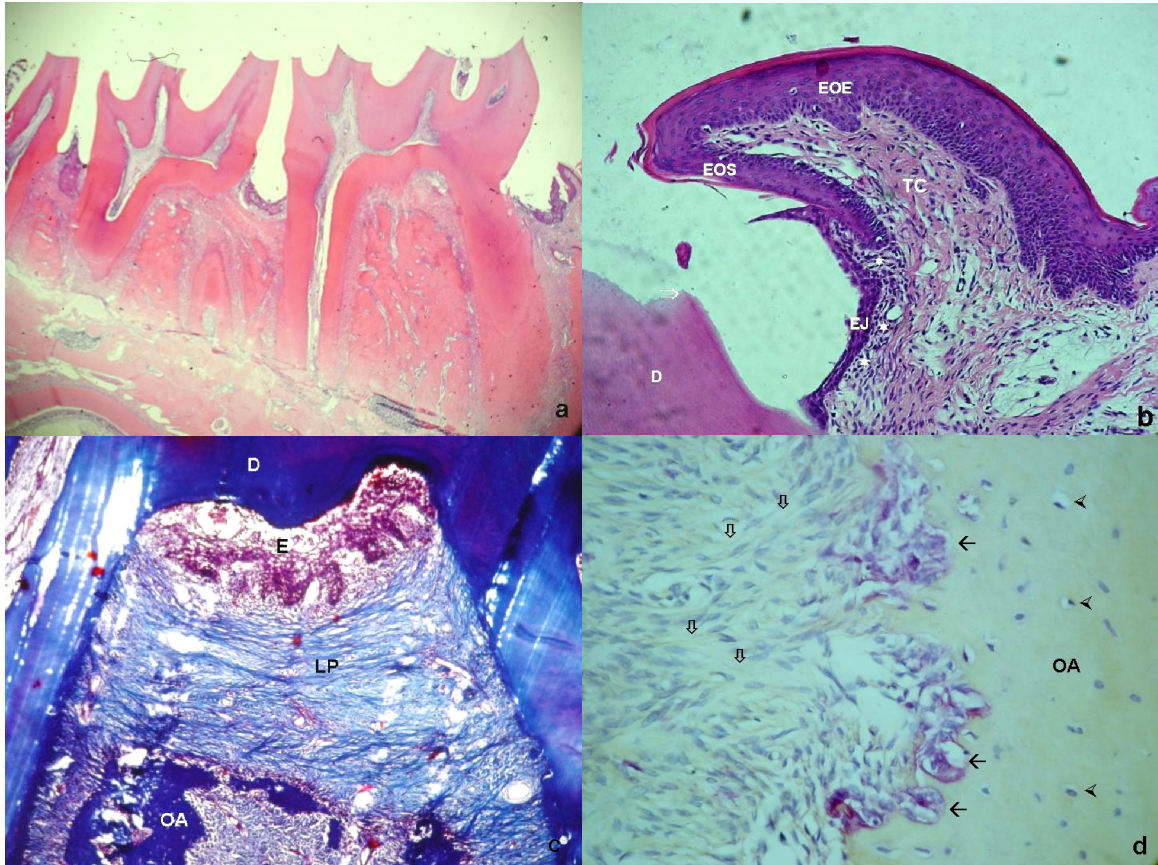


Figura 14 - Análise dos grupos com ligadura

Aspectos histológicos dos espécimes nos quais foi induzida doença periodontal.

a) Grupo GCsAL H-E 25x; b) Papila gengival H-E 200x; c) Área de bifurcação radicular Mallory 100x; d) Marcação de células TRAP+ 400x. D: dentina, EOE: epitélio oral externo, EOS: epitélio oral do sulco, EJ: epitélio juncional, TC: tecido conjuntivo, ⇒: junção cimento-esmalte, \* infiltrado inflamatório, LP: ligamento periodontal, OA: osso alveolar, C: cimento, ⇓: fibras colágenas, <: osteócitos, ←: células TRAP+.

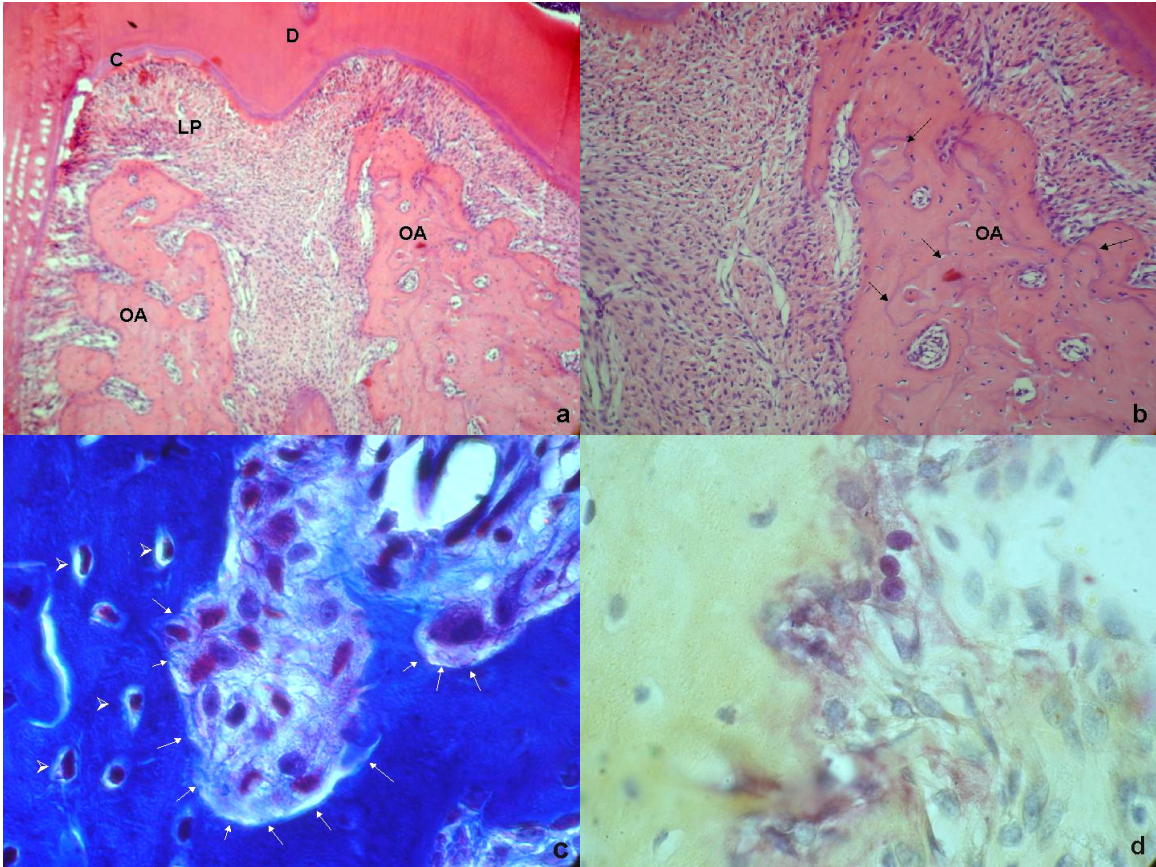


Figura 15 - Análise do processo de remodelação óssea

Aspectos histológicos representativos da atividade de remodelação óssea. a) Região de bifurcação radicular H-E 100x; b) Porção interradicular do osso alveolar com remodelação óssea caracterizada pela presença de linhas reversas (↓) H-E 200x; c) Osso alveolar com lacunas Howship preenchida por osteoclasto caracterizando área de reabsorção óssea Mallory 400x; d) Células TRAP+ multinucleares e mononucleares sobre a superfície do osso alveolar TRAP 600x. D: dentina, AO: osso alveolar, C: cimento, LP: ligamento periodontal



## 6 DISCUSSÃO

O estudo dos mecanismos de ação da CsA no metabolismo dos tecidos ósseo, tecido epitelial e tecido conjuntivo, desenvolvidos em modelos animais, estudos clínicos em seres humanos e estudos *in vitro*, são frequentemente descritos na literatura (AFONSO et al., 2003; AYANOGLU; LESTY, 1999; FU et al., 1995; KING et al., 1993; KATAOKA et al., 2005; KAWAMURA, 2006). Alterações no metabolismo desses tecidos, manifestadas como efeito adverso ao uso do fármaco, podem representar um possível fator de risco para a doença periodontal (BIRRAUX et al., 2006; CHIN et al., 2006).

A utilização de modelos animais no desenvolvimento de novos estudos experimentais pode apresentar uma série de vantagens para o pesquisador, além das implicações éticas atribuídas a realização de pesquisa com seres humanos (BENTZEN et al., 2005; FU et al., 1999; KIMURA et al., 2000; MELLER et al., 2002; SHEN; FU; HSIEH, 2001; TAKATA et al., 1999). A facilidade na manipulação desses modelos, o desenvolvimento de desenhos experimentais para várias doenças, a possibilidade do uso associado de fármacos e a indução de doença periodontal, são algumas das vantagens na utilização de modelos animais em pesquisa (GAU et al., 2005; PAGE; SCHROEDER, 1982; PRABHU; MEHTA, 2006).

O modelo experimental de periodontite induzida por ligadura em ratos, desenvolvido nesse estudo, reproduz uma metodologia confirmada pela literatura (FERNANDES et al., 2007; GALVÃO et al., 2003; KHUR, et al., 2004; NASSAR, et al., 2004; RODINI, 2005; SEMENOFF et al., 2006). A utilização desse modelo é justificada pela semelhança anatômica, fisiológica e histológica entre a região de molares do rato e do homem, possibilitando a avaliação macroscópica e

microscópica dos mecanismos envolvidos na evolução e modulação da doença periodontal.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da indução de doença periodontal no metabolismo dos tecidos ósseo, tecido epitelial e tecido conjuntivo, no periodonto de ratos imunossuprimidos pela administração da CsA.

A indução de doença periodontal por meio da inserção de ligadura nos animais submetidos previamente ao uso da CsA por um período de trinta dias, à partir do início do experimento, conforme descrito no grupo GCsAL, segue uma metodologia diferente da maioria dos estudos descritos na literatura (CETINKAYA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2003; NASSAR et al., 2004), nos quais a indução da doença se dá a partir do início do estudo, juntamente com a utilização do medicamento.

O desenvolvimento desse protocolo medicamentoso é baseado na hipótese que as alterações teciduais desencadeadas pela indução de doença periodontal nos animais, podem sofrer influência dos mecanismos de ação do fármaco no metabolismo dos tecidos. Os resultados observados no presente estudo quanto a densidade radiográfica, demonstraram que a exposição à CsA não gerou alteração significativa em nenhuma condição experimental. Alguns estudos têm relacionado o efeito adverso de osteoporose e osteopenia ao uso do medicamento (KAWANA et al., 1996; RUCINSKI; LIU; EPSTEIN, 1994; SHEN; FU; HSIEH, 2001; WADA et al., 2006). De acordo com Fu et al. (1999) a CsA apresenta alterações distintas no metabolismo do osso alveolar, sendo observado em seu estudo, um aumento de atividade osteoclástica nos sítios periodontais e redução no processo de formação óssea nos sítios sinfisais. Movsowitz et al. (1988) afirmam que as alterações no metabolismo ósseo observadas em modelos animais estão relacionadas com uma

interação complexa entre a CsA e as citocinas. Assim, os complexos mecanismos envolvidos no processo de remodelação óssea, podem não ser tão facilmente observados na avaliação da densidade radiográfica.

A quantificação do suporte ósseo periodontal é uma ferramenta importante na análise da influência de fatores modificadores sobre as alterações ósseas decorrentes da doença periodontal (KLAUSEN; EVANS; SFINTESCU, 1989). Dentre estes fatores podemos citar os efeitos adversos da CsA sobre o metabolismo ósseo. A manutenção das características fisiológicas do SOP indica normalidade deste metabolismo. No presente estudo a análise radiográfica do SOP demonstrou que os grupos GL e GCsA sofreram uma maior perda linear de SOP, em relação aos grupos GC e GCsAL. Assim, é possível considerar que a diminuição do suporte ósseo periodontal (SOP) esteve diretamente relacionada com a indução da doença periodontal nos animais (GL), conforme os estudos de (FERNANDES et al., 2007; KHUR et al., 2004; SEMENOFF et al., 2006). O uso exclusivo da CsA (GCsA) pode ter promovido alteração no metabolismo do tecido ósseo e conseqüentemente, ter gerado redução do SOP, como demonstrado nos estudos de alguns autores (KAWANA et al., 1996; RUCINSK; LIU; EPSTEIN, 1994; SHEN; FU; HSIEH, 2001; WADA et al., 2006). Ainda, a manutenção do SOP no GCsAL assume maior importância por considerarmos que a associação do processo inflamatório neste grupo (GCsAL) ocorreu trinta dias após à exposição a CsA. Esses achados estão de acordo com Nassar et al. (2000), que observaram através de análise radiográfica, a diminuição na intensidade da perda óssea alveolar, em ratos com doença periodontal induzida por ligadura, previamente expostos à CsA. Nassar et al. (2004) discutem em seu estudo a possibilidade de diminuição da reabsorção óssea em animais nos quais a doença periodontal foi induzida simultaneamente a exposição à

CsA. Segundo os autores, esta condição pode ser o resultado da inibição da resposta imunológica das células T causada pela CsA durante os estágios iniciais da indução de doença periodontal em ratos. Cetinkaya et al. (2006) observaram a diminuição no processo de reabsorção óssea em ratos com doença periodontal induzida por ligadura submetidos ao uso simultâneo da CsA. Em outro estudo Gonçalves et al. (2003) não observaram aumento da reabsorção óssea na periodontite induzida associada a presença de CsA, Nefidepina ou ambas.

A enzima fosfatase alcalina está relacionada com a atividade dos osteoblastos no processo fisiológico de remodelação óssea. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos grupos experimentais, entretanto, houve uma tendência para menores valores da atividade desta enzima nos grupos submetidos ao uso da CsA (GCsA e GCsAL). A literatura apresenta resultados divergentes quanto a influência da exposição a CsA sobre a atividade da fosfatase alcalina. Nassar et al. (2004) observaram uma diminuição não significativa nos níveis de atividade desta enzima e sugeriram em seu estudo que a CsA teria um papel negativo no processo de formação óssea. Por outro lado, Spolidório, Spolidório e Holzhausen (2004) observaram aumento na atividade da enzima e sugerem a participação da CsA no processo de formação óssea. Ainda, Cetinkaya et al. (2006), também observaram em seu estudo um aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina.

Outra ferramenta de avaliação dos eventos biológicos da doença periodontal é a mensuração do espaço ocupado pelo ligamento periodontal na região da bifurcação radicular do dente no qual foi induzida a doença periodontal (GONÇALVES et al., 2003; NOCITI JÚNIOR et al., 2001). No presente estudo, foi avaliada a influência da exposição prévia à CsA sobre esse evento biológico. Os

resultados mostraram que os grupos submetidos à indução da doença periodontal (GL e GCsAL) foram semelhantes entre si e apresentaram maiores valores médios quando comparados aos grupos sem processo inflamatório (GC e GCsA). As alterações observadas no estudo estiveram mais associadas com a presença de inflamação do que a ação do fármaco sobre o metabolismo ósseo.

O processo de remodelação óssea está intimamente relacionado com a atividade celular de uma célula gigante multinucleada denominada osteoclasto. Os osteoclastos participam do processo de *turnover* ósseo e desempenham papel fundamental nos fenômenos de reabsorção e aposição óssea (CEDRIC, 1982; COLE; WALTERS, 1987; ODDIE et al., 2000). A fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) é um marcador histoquímico e bioquímico capaz de reconhecer o processo de diferenciação celular dessa célula. A quantificação de células TRAP+ no tecido ósseo mostrou uma tendência para marcações mais evidentes em GCsA, GL e GCsAL, relação a GC, embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos. Em seu estudo, Li et al. (1991) discutem a influência da CsA no bloqueio da atividade de células osteoclásticas através do mecanismo de inibição da produção de IL-1, favorecendo o processo de formação óssea. Contudo, Rucinsk, Liu e Epstein (1994), Fu et al. (1999) e Nassar et al. (2004) observaram um aumento no número de osteoclastos associado à utilização da CsA e a indução de doença periodontal em modelos animais.

O aumento do volume gengival é um dos efeitos adversos associado ao uso da CsA, sendo freqüentemente descrito na literatura (AFONSO et al., 2003; AYANOGLU; LESTY et al., 1999; MARIANI et al., 1993; RAMALHO et al., 2003). O exato mecanismo pelo qual o fármaco promove essa alteração ainda não é totalmente conhecido (BOLTCHI; REES; IACOPINO, 1999; HALLMON;

ROSSMANN, 1999; KATAOKA et al., 2005) e uma série de hipóteses tem sido verificadas. Segundo Ayanoglou e Lesty (1999) o aumento gengival induzido pela utilização da CsA é resultado da vasodilatação, do aumento do volume da matriz extracelular e aumento da espessura do epitélio.

No presente estudo, a área total do tecido gengival (ATTG), observada nos cortes da papila gengival, apresentou maiores valores médios de área nos grupos experimentais (GCsA, GCsAL e GL), sendo que, a indução de doença periodontal nos animais previamente expostos à CsA (GCsAL) potencializou ainda mais o aumento do volume gengival.

Na análise da papila gengival em relação aos seus tecidos constituintes, epitélio e conjuntivo, foi verificado que embora tenham ocorrido modificações nos dois tecidos após a exposição à CsA e ao processo inflamatório subsequente, as alterações observadas no tecido conjuntivo foram maiores.

A ação da CsA sobre a fagocitose de colágeno como descrito por Ayanoglou e Lesty (1999) e Kataoka et al. (2003) pode ter sido responsável por uma maior proporção do tecido conjuntivo quando comparados juntamente com a área total do tecido gengival em todos os grupos. De acordo com Auad e Quirino (2000) a principal característica da hiperplasia gengival induzida pela CsA é o aumento do tecido conjuntivo. A observação do aumento desta proporção frente à associação com o processo inflamatório trinta dias após o início do experimento pode estar relacionada ao aumento de mediadores inflamatórios associados à proliferação celular, aumento de vasos sangüíneos e formação do edema, característicos dos eventos biológicos da patogenia da doença periodontal (CARRANZA, 2004; LÖE; THELLADE; JENSEN, 1965). Desta forma, embora tenha sido observado o aumento volumétrico do tecido gengival, a proporção entre seus componentes foi

significativamente influenciada apenas pelo processo inflamatório. Estes achados estão em concordância com os resultados de (GALVÃO et al., 2003).

Com base no limite desse estudo, é possível sugerir que a complexa relação da CsA com o metabolismo dos tecidos ósseo, epitelial e conjuntivo, pode ser influenciada pelo desenvolvimento da doença periodontal induzida por ligadura em ratos.

## 7 CONCLUSÃO

A associação do uso prévio da CsA com a indução de doença periodontal promoveu a manutenção no nível do suporte ósseo periodontal (SOP).

A perda óssea observada na área do ligamento periodontal (ALP) esteve relacionada apenas com a indução da doença periodontal e não sofreu influência da presença do medicamento.

A área total do tecido gengival (ATTG) sofreu influência da presença do medicamento e da indução da doença periodontal, sendo que a associação dessas duas variáveis potencializou ainda mais o aumento do volume gengival.

O aumento do volume gengival observado durante a análise da papila gengival se deu principalmente pela ação das variáveis (CsA e doença periodontal) no metabolismo do tecido conjuntivo. O metabolismo do tecido epitelial foi menos influenciado pela ação dessas variáveis.



## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; RADFAR, M. A review of drug-induced oral reactions. **J. Contemp. Dent. Pract.**, Cincinnati, v. 1, n. 4, p. 10-31, Feb. 2003.

AFONSO, M. et al. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 74, n. 1, p. 51-56, Jan. 2003.

AUAD, R. M.; QUIRINO, M. R. S. Crescimento gengival induzido pela Ciclosporina. **Rev. Biociênc.**, Taubaté, v. 6, n. 2, p. 55-60, jul./dez. 2000.

AYANOGLU, C. M.; LESTY, C. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in the rat: a histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 34, n. 1, p. 7-15, Jan. 1999.

BACH, J. F. Lessons for transplant immunosuppression from the usage of cyclosporin in autoimmune diseases. **Transplant. Proc.**, New York, v. 26, n. 5, p. 3077-81, Oct. 1994.

BARAK, S.; ENGELBERG, I. S.; HISS, J. Gingival hyperplasia caused by nifedipine. Histopathologic findings. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 58, n. 9, p. 639-642, Sep. 1987.

BARCLAY, S. et al. The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, n. 5, p. 311-314, May 1992.

BENTZEN, B.H. et al. A comparison of two models of experimental periodontitis in rats. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.**, Scandinavia, v. 32, n. 2, p. 73-80, 2005.

BIRRAUX, J. et al. The effect of cyclosporin on cell division and apoptosis in human oral keratinocytes. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 41, n. 4, p. 297-302, Aug. 2006.

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

CALNE, R.Y. et al. Cyclosporin-A in clinical organ grafting. **Transplant Proc.**, New York, v. 13, n. 1, p. 349-358, 1981.

CAMARGO, P. M. et al. Treatment of drug-induced gingival enlargement: aesthetic and functional considerations. **Periodontol 2000**, Denmark, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2001.

CARRANZA, F. A. Perda óssea e padrões de destruição óssea, In: CARRANZA, N. T. (Org.). **Carranza periodontia clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 316-330.

CEDRIC, M. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcif Tissue Int.**, New York, v. 34, p. 285-290, 1982

CETINKAYA, B. O. et al. The effect of Cyclosporin A on alveolar bone in rats subjected to experimental periodontal disease. **Toxicol Pathol.**, United States, v. 34, n. 6, p. 716-722, 2006.

CHABRIA, D.; WEINTRAUB, R. G.; KILPATRICK, N. M. Mechanisms and management of gingival overgrowth in paediatric transplant recipients: a review. **Int. J. Paediatric Dent.**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 220-229, July. 2003.

CHIN, Y. T. et al. Upregulation of the expression of epidermal growth factor and its receptor in gingival upon cyclosporin a treatment. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 77, n. 4, p. 647-656, Apr. 2006.

CHIU, H. C. et al. Does nifedipine aggravate cyclosporine-induced gingival overgrowth? An experiment in rats. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 72, n. 4, p. 532-537, Apr. 2001.

COLE, A. A.; WALTERS, L. M. Tartrate-resistant Acid Phosphatase in bone and cartilage following descalcification and cold-embedding in plastic. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Jena, v. 35, n. 2, p. 203-206, 1987.

ELLIS, J. S. et al. Prevalence of gingival overgrowth in transplant patients immunosuppressed with tacrolimus. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 126-31, Feb. 2004.

FERNANDES, M. I. et al. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Braz. Oral. Res.**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 216-221, 2007.

FU, E. et al. Dose-dependent Gingival Overgrowth Induced by Cyclosporin in Rats. **J. Periodontol.**, Birmingham v. 66, n. 7, p. 594-598, July. 1995.

FU, E. et al. Effects of Cyclosporin A on Alveolar Bone: An experimental study in the rat. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 70, n. 2, p.189-194, Feb. 1999.

FU, E. et al. A histomorphological investigation of the effect of cyclosporin on trabecular bone of the rat mandibular condyle. **Arch. Oral Biol**, v. 46, n. 12, p. 1105-1110, Dec. 2001.

GALVÃO, M. P. A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal disease in rats. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 56-62, jan./mar. 2003.

GASPERSIC, R.; STIBLAR-MARTINCIC, D.; SKALERIC, U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. **Eur. J. Oral. Sci.**, Copenhagen, v. 110, n. 2, p. 125-129, 2002.

GAU, C. H. et al. Effect of cyclosporin a on the expression of inducible nitric oxide synthase in the gingival of rats. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 76, n. 12, p. 2260-2266, Dec. 2005.

GIUSTINIANI, S.; ROBUSTELLI, D. C. F.; MARIENI, M. Hyperplastic gingivitis during diltiazem therapy. **Int. J. Cardiol.**, Netherlands, v. 15, n. 2, p. 247-249, May. 1987.

GONÇALVES, P. F. et al. Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis – a study in rats. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n.1, p. 46-50, jan./mar. 2003.

GYORFI, A. et al. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 21, n. 9, p. 601-605, 1994.

HALLMON, W. W.; ROSSMANN, J. A. The role of drug in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. **Periodontol 2000**, Denmark, v.21, n.1, p.176-196, 1999.

HASSEL, T. M.; HEFTI, A. F. Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, United States, v. 2, n. 1, p. 103-137, 1991.

ILGENLI, T.; ATILLA, G.; BAYLAS H. Effectiveness of Periodontal Therapy in Patients with Drug-Induced Gingival Overgrowth. Long-Term Results. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 70, n. 9, p. 967-972, Sep. 1999.

JAMES, J. A. et al. Reduction in gingival overgrowth associated with conversion from cyclosporin A to tacrolimus. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p.144-148, Feb. 2000.

JAMES, J. A. et al. The calcium channel blocker used with cyclosporine has an effect on gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.27, n.2, p.109-115, 2000.

KAHAN, B. D. Cyclosporine. **N. Engl. J. Med.**, United States, v. 321, n. 25, p. 1725-1738, 1989.

KANTARCI, A. et al. Clinical effects of periodontal therapy on the severity of cyclosporin a-induced gingival hyperplasia. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 70, n. 6, p. 587-593, June 1999.

KATAOKA, M. et al. Decreased expression of  $\alpha 2$  integrin in fibroblasts isolated from cyclosporine A-induced gingival overgrowth in rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 5, p. 533-537, Oct. 2003.

KATAOKA, M. et al. Drug-induced gingival overgrowth – a review. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 28, n. 10, p. 1817-1821, Oct. 2005.

KAWAMURA, J. Y. **O efeito da Ciclosporina A na população de células apresentadoras de antígenos em hiperplasia gengival medicamentosa.** 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KAWANA, K. et al. The effect of Cyclosporin A administration on bone metabolism in the rat evaluated by biochemical markers. **J. Endocrinol Invest.**, Milam, v. 19, n. 8, p. 499-504, Sep. 1996.

KHOORI, A. H. et al. The effect of Ciclosporine with and without Nifedipine on Gingival Overgrowth in Renal Transplant Patients. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 69, n. 4, p. 236-241, 2003.

KHUR, A. et al. Observations on experimental periodontitis in rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.39, n.2, p.101-106, Apr. 2004.

KIMURA, S. et al. Induction of experimental periodontitis in mice with porphyromonas gingivalis-adhered ligatures. **J Periodontol.**, Birmingham, v. 71, n. 7, p. 1167-1173, July. 2000.

KING, G. N. et al. Gingival hyperplasia in renal allograft recipients receiving cyclosporin - A and calcium antagonists. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.20, n.4, p.286-293, Apr. 1993.

KLAUSEN, B.; EVANS, R. T.; SFINTESCU, C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.97, n. 6, p. 494-499, Dec. 1989.

LI, X. Q. et al. Differential patterns of incorporation and remodeling among various types of bone grafts. **Acta Anat.**, Switzerland, v.140, n.3, p. 236-244, 1991.

LÖE, H.; THELLADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 36, p. 177-187, 1965.

MARIANI, G. et al. Ultrastructural features of Cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 64, n. 11, p. 1092-1097, Nov. 1993.

MAVROGIANNIS, M. et al. The management of drug-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 33, n. 9, p. 434-439, June. 2006.

MCDONALD, P. J.; PRUUL, H. Phagocyte uptake and transport of azithromycin. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Germany, vol. 10, n. 10, p. 828-833, Oct. 1991.

MELLER, A.T. et al. Oral mucosa alterations induced by cyclosporine in mice: morphological features. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, vol. 37, n. 6, p. 412-415, Dec. 2002.

MONTEBUGNOLI, L.; SERVIDIO, D.; BERNARDI, F. The role of time in reducing gingival overgrowth in heart transplanted patients following cyclosporin therapy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 8 , p. 611-614, Aug. 2000.

MOVSOWITZ, C. et al. Cyclosporin A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration. **Endocrinology**, United States, v. 123, n. 5, p. 2571-2577, Nov. 1988.

NASSAR, C. A. et al. Avaliação radiográfica do efeito da ciclosporina-A no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos. **Rev. Odontol. UNESP.**, São Paulo, v. 29, n. 1/2, p.183-193, 2000.

NASSAR, C. A. et al. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 39, n. 3, p.143-148, June 2004.

NASSAR, P. O.; NASSAR, C. A.; SPOLIDORIO, L. C. Efeito da Ciclosporina A sobre o metabolismo ósseo alveolar. **RGO**, Porto Alegre, v. 51, n. 5, p. 435-439, nov./dez. 2003.

NOCITI JÚNIOR, F. H. et al. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 36, n. 6, p.361-366, Dec. 2001.

ODDIE, G. W. et al. Structure, Function, and Regulation of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase. **Bone**, United States, v. 27, n. 5, p. 575-584, Nov. 2000.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. **Periodontitis in man and other animals: a comparative review**. Basel, Switzerland: Karger; 1982. 330 p.

PRABHU, A.; MEHTA, D. S. A morphologic comparison of gingival changes influenced by cyclosporine and tacrolimus in rats: an experimental study. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 77, n. 2, p. 265-270, Feb. 2006.

RAMALHO, V. L. C. et al. Hiperplasia gengival induzida por Ciclosporina A. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 210-213, 2003.

RATEITSCHAK-PLÜSS, P. E. M. et al. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 10, n. 3, p.237-246, May. 1983.

RICARDO, L. H. **Estudo comparativo da utilização local de tetraciclina, minociclina e ácido cítrico como adjuntos à instrumentação periodontal: análise histológica e histomorfométrica em ratos**. 2002. 160f. Tese (Doutorado em

Biopatologia Bucal) - Departamento de Odontologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José dos Campos, 2002.

RODINI, C. O. **Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura:** caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9. 2005. 149f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

ROMITO, G. A. et al. Relationship of subgingival and salivary microbiota to gingival overgrowth in heart transplant patients following Cyclosporin A therapy. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 75, n. 7, p. 918-924, July.2004.

RUCINSKI, B.; LIU, C. C.; EPSTEIN, S. Utilization of Cyclosporine H to elucidate the possible mechanisms of Cyclosporine A-induced osteopenia in the rat. **Metabolism**, United States, v. 43, n. 9, p. 1114-1118, Sep. 1994.

SEMENOFF, A. S. et al. Dois métodos histométricos distintos comparativos de periodontite induzida em ratos. **R. Periodontia**, v. 16, n. 3, p. 5-11, set. 2006.

SEYMOUR, R. A. Calcium channel blockers and gingival overgrowth. **Br. Dent. J.**, England, v. 170, n. 10, p. 376-379, 1991.

SEYMOUR, R. A.; ELLIS, J. S.; THOMASON, J. M. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 217-223, Apr. 2000.

SEYMOUR, R. A.; JACOBS, D. J. Cyclosporin and the gingival tissues. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, n. 1, p. 1-11, 1992.

SEYMOUR, R. A.; THOMASON, J. M.; ELLIS, J. S. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol**, Copenhagen, v. 23, n. 3, parte 1, p. 165-175, Mar. 1996.

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

SPOLIDÓRIO, L. C. et al. Influence of age on combined effects of Cyclosporin and Nifedipine on rat alveolar bone. **J. Periodontol.**, Copenhagen, v. 75, n. 2, p. 268-272, Feb. 2004.

SPOLIDÓRIO, L. C. et al. Morphometric evaluation of gingival overgrowth and regression caused by cyclosporin in rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 36, n. 6, p. 384-389, Dec. 2001.

SPOLIDÓRIO, L. C.; SPOLIDÓRIO, D. M.; HOLZHAUSEN, M. Effects of Long-term cyclosporin therapy on the periodontium of rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 39, n. 4, p. 257-262, 2004.

TAKATA, T. et al. Periodontitis in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*): a potential animal model for human periodontal disease. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 70, n. 2, p. 195-200, Feb. 1999.

THOMASON, J. M. et al. Determinants of gingival overgrowth severity in organ transplant patients. An examination of the role of HLA phenotype. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, n. 7, p. 628-634, July. 1996.

TORREZAN, P. R. et al. Hipertrofia gengival em transplantados renais. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 200-205, 2005.


TRACKMAN, P. C.; KANTARD, A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, Boca Raton, v. 15, n. 3, p. 165-175, June 2004.

WADA, C. et al. High-turnover osteoporosis is induced by Cyclosporin A in rats. **J. Bone. Miner. Metab.**, Tokyo, v. 24, n. 3, p. 199-205, 2006.



## 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.

  
Prof.ª Dr.ª 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.

Felipe da Silva Peralta

Taubaté, \_\_\_\_\_

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)