

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DO EFEITO DA CICLOSPORINA-A NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS

Carlos Augusto NASSAR*

Patrícia OEHLMEYER*

Ricardo Samih Georges ABI RACHED*

Luís Carlos SPOLIDORIO*

Elcio MARCANTONIO JUNIOR*

- **RESUMO:** A CsA é uma droga imunossupressora muito usada para prevenir a rejeição de enxertos em transplantes alógenos. O aumento gengival é o principal efeito colateral na cavidade bucal, porém existem muitas dúvidas do seu efeito sobre o osso alveolar. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da CsA sobre a perda óssea alveolar, em ratos imunossuprimidos com 10 mg/Kg de peso corporal/dia, na doença periodontal induzida por ligadura. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 7 grupos, sendo eles: grupo I (controle) – sem ligadura e sem tratamento com CsA; grupo II – somente presença de ligadura; grupo III – presença de ligadura e tratamento com CsA; grupo IV – tratamento com CsA e presença de ligadura; e grupos V, VI e VII – somente tratamento com CsA, por 15, 30 e 45 dias, respectivamente. Os resultados radiográficos demonstraram uma menor perda óssea alveolar nos grupos tratados com CsA, em relação ao grupo que foi somente submetido à presença da ligadura, mas com perda óssea maior que o grupo controle. Logo, a imunossupressão induzida por CsA diminui, em média, a intensidade de perda óssea alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Ciclosporina; osso alveolar; ligadura; radiografia; doença periodontal.

* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

Introdução

A atividade metabólica dos tecidos periodontais é intensa e peculiar, respondendo prontamente aos diferentes estímulos a que está sujeita essa atividade, seja ele bacteriano, imunológico ou mecano-funcional. Dentre os mecanismos de defesa, a reação inflamatória é a mais comum e freqüente. A microbiota do biofilme bacteriano se destaca como fator etiológico local para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal e pode estar associada a alguns fatores sistêmicos, como diabete mellitus, hormônios sexuais, fumo, nutrição, discrasias sanguíneas (aids) e drogas.²¹

A ciclosporina (CsA) é uma droga imunossupressora usada, principalmente, para inibir a rejeição de órgãos em transplantes alógenos, a qual pode induzir alterações gengivais, tanto em humanos quanto em animais.^{5,13}

Ainda é indefinida a ação da terapia sistêmica dessa droga sobre a evolução da gengivite e da periodontite, mas aventa-se a hipótese de que possa influenciar o curso da doença periodontal, modificando a resposta inflamatória do hospedeiro aos produtos da microbiota do biofilme bacteriano.¹⁶ A ação da CsA no periodonto, envolvendo o osso alveolar, não é muito clara, embora já tenha sido comprovado que, *in vitro*, ela inibe a ação de osteoclastos.¹⁹ Estudos em modelos animais e humanos demonstraram que a CsA pode aumentar a atividade osteoblástica e diminuir a atividade osteoclástica,^{10,22} embora o mecanismo e os resultados mais concretos ainda permaneçam incertos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, radiograficamente, o efeito da CsA sobre o osso alveolar, em ratos, com doença periodontal induzida por ligadura.

Material e método

Animais utilizados

Foram utilizados 57 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman) machos, adultos, com peso inicial de aproximadamente 100 gramas, alimentados com ração e água *ad libitum*. Após a avaliação clínica e a verificação das boas condições gengivais, os ratos foram divididos aleatoriamente em sete grupos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos de ratos (n) com os respectivos tempo de permanência da ligadura (dias), tratamento com CsA (dias) e tempo total de experimento (dias). O grupo I foi considerado controle

Grupos	Nº de ratos Por grupo (n)	Tratamento	Tempo de Permanência da Ligadura (dias)	Tempo de CsA (dias)	Tempo total experimento (dias)
I	5	30 dias (sem ligadura e sem CsA)	–	–	30
II	13	30 dias somente com ligadura	30	–	30
III	10	15 dias Ligadura + 15 dias CsA com ligadura	30	15	30
IV	6	15 dias CsA + 30 dias CsA com ligadura	30	45	45
V	10	15 dias somente com CsA	–	15	15
VI	8	30 dias somente com CsA	–	30	30
VII	5	45 dias somente com CsA	–	45	45
Total	57				

Colocação do irritante gengival (ligadura)

Para a colocação do irritante gengival, os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com tribromoethanol a 5%, na dosagem de 2 mL/100g, de peso corporal, intraperitonealmente.

Após a anestesia, os ratos foram então posicionados em mesa operatória com abertura da cavidade bucal realizada. Em seguida, foram realizados afastamentos temporários com o auxílio de uma sonda exploradora número 5, entre primeiro e segundo molares inferiores, para a colocação da ligadura (fio de algodão de cor preto, nº 24, marca Corrente), com o auxílio de uma pinça clínica adaptada e conseqüente nós cirúrgicos para a amarra e posicionamento do fio de algodão, dos lados esquerdo e direito da mandíbula, atuando, assim, como um irritante gengival, favorecendo o acúmulo do biofilme bacteriano, conforme técnica preconizada por Johnson.⁹

Ciclosporina (CsA*)

Diluição da CSA

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

Tratamento com CsA

A CsA foi administrada diariamente na concentração de 10 mg/kg de peso corporal/dia, por via subcutânea, conforme Wassef et al.²⁰ e Spolidorio,¹⁸ durante os períodos previamente estabelecidos para cada grupo experimental.

Método para análise radiográfica

As tomadas radiográficas das mandíbulas dos dois lados (direito e esquerdo) foram feitas pelo uso de um sistema de imagem digital computadorizada, CDR (Radiografia Dental Computadorizada, Schick Technologies, Inc., Dialom Dental Products), utilizando o aparelho de R-X GE1000, com tempo de exposição de 12 impulsos/segundo, 65 kVp, 10 mA, com distância foco/filme de 50 cm. Após as tomadas radiográficas, as radiografias digitais foram analisadas em 3 medidas e retirada uma média entre elas, por meio de uma medida linear, que percorria a distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior do rato, no próprio sistema de imagem digital CDR, com as medições em mm. As médias das medidas das distâncias obtidas foram analisadas pelos testes ANOVA e Tukey, como forma de observar a significância entre os resultados.

Resultado

Aspectos radiográficos

Todas as radiografias das hemimandíbulas dos grupos experimentais mostraram perdas ósseas alveolares maiores em relação ao grupo I (controle). As perdas ósseas alveolares foram notadas principalmente nas regiões

* Sandimmum Neoral (Novartis).

mesiais dos primeiros molares inferiores de ambos os lados. Nos demais dentes não foi possível avaliar a perda óssea, uma vez que as imagens eram sobrepostas.

Os ratos do grupo II apresentaram maiores perdas ósseas alveolares envolvendo a área de furca e notou-se que a crista óssea alveolar nas hemimandíbulas desses ratos (grupo II) apresentava-se reabsorvida, próxima ao osso basal da mandíbula. Nos demais grupos, a perda óssea não foi acentuada, não houve envolvimento de furca que pudesse ter sido notado radiograficamente, apenas houve maior variação na altura das cristas ósseas alveolares, por conseqüente perda óssea maior nos grupos III e IV em relação aos grupos os V, VI e VII.

Medidas radiográficas digitais de perda óssea da face mesial

As médias das medidas radiográficas digitais foram submetidas aos testes estatísticos ANOVA e Tukey. Na Tabela 2, demonstramos as médias da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar.

Tabela 2 – Médias das medidas da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar (mm) da mesial de primeiros molares inferiores, em relação aos vários tratamentos, utilizando o Teste Tukey ($\alpha < 0,05$)

GRUPO	MÉDIA
I (controle) (n = 10)	1,06 ± 0,09 A
II (n = 26)	1,89 ± 0,27 B
III (n = 20)	1,61 ± 0,14 C
IV (n = 12)	1,58 ± 0,24 CE
V (n = 20)	1,29 ± 0,08 D
VI (n = 16)	1,38 ± 0,09 DE
VII (n = 10)	1,37 ± 0,17 DE

* Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5%. O n corresponde ao número de hemimandíbulas por grupo.

Mediante esses achados, pode-se observar que:

- O grupo I (controle) é estatisticamente diferente de todos os demais grupos, apresentando média de perda óssea menor.
- O grupo II (somente com ligadura) apresentou média de perda óssea alveolar maior que todos os demais grupos que receberam algum tipo de

tratamento, no caso os grupos III, IV, V, VI e VII, ou que não recebeu qualquer tipo de tratamento como o grupo I (controle).

- O grupo III (ligadura + tratamento com CsA) apresentou média de perda óssea alveolar maior que os grupos I, V, VI e VII, demonstrando média menor que o grupo II, como citado anteriormente, mas não sendo diferente estatisticamente em relação à média do grupo IV.
- O grupo IV (tratamento com CsA + ligadura) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação as médias dos grupos III, VI e VII, mas com diferença estatística com os demais grupos, tendo média de perda óssea alveolar menor que o grupo II e maior que os grupos V e I.
- O grupo V (somente CsA por 15 dias) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos VI e VII, mas demonstrando média de perda óssea alveolar menor que os grupos II, III e IV e maior que o grupo I (controle).
- Os grupos VI e VII apresentaram médias com resultados estatísticos semelhantes, em que ambos demonstraram não ser, em média, estatisticamente diferentes entre si e com os grupos IV e V, mas apresentando diferença estatisticamente significativa com os demais grupos, com média de perda óssea maior que o grupo I (controle) e média menor que os grupos II e III.

Discussão

Ciclosporina (CsA)

A CsA é apresentada para uso endovenoso e por via oral. Após a administração oral, a droga é absorvida no trato gastrointestinal, e a absorção e a biodisponibilidade absoluta dessa substância demonstram alta variabilidade interindividual.¹²

Em nosso trabalho, a CsA foi injetada diariamente no tecido subcutâneo da região dorsal, na concentração de 10 mg/kg de peso corporal, concentração essa baseada no trabalho de Wassef et al.,²⁰ que mostrou que a dose de 10 mg/kg de peso corporal/dia é bem tolerada pelo rato, mantendo uma concentração sérica constante. Também se baseou no trabalho desenvolvido por Spolidorio,¹⁷ quando foi usado o teste cutâneo de hipersensibilidade tardia provocado pelo DNCB (2,4 dinitroclorobenzeno), para a avaliação da resposta imunológica de ratos imunossuprimidos pela CsA. Os resultados obtidos

mostraram baixos índices de positividade às reações cutâneas, confirmando que a dose de 10 mg/kg de peso corporal/dia é imunossupressora e bem tolerada pelo rato.

Em humanos adultos, a concentração de CsA no sangue para uma eficiente imunossupressão, em transplantes renais, corresponde aproximadamente a 4,5 e 10 mg/kg de peso corporal/dia.⁴

Para estabelecer a dose imunossupressora efetiva para cada indivíduo, o monitoramento sérico é importante e pode ser feito por radioimunoensaio ou cromatografia líquida de alta pressão.²

A CsA e remodelação óssea

A literatura científica relata poucos estudos, tanto em humanos quanto em estudos experimentais, *in vivo* e *in vitro*. Os trabalhos que envolvem esse tema visam preferencialmente à cavidade bucal, área de atuação dos cirurgiões dentistas.

Os efeitos da CsA no osso são dose e tempo-dependentes. A idade dos ratos e o tipo de osso modificam a resposta de remodelação óssea quando da atuação da CsA.¹ Alguns trabalhos mostraram que altas doses aumentam a reabsorção óssea e conseqüente desses tecidos.^{1,7}

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a presença de ligadura, por período estabelecido (grupo II), induz perda óssea alveo-lar. Por outro lado, quando há tratamento sistêmico com CsA, a perda óssea é menor. Esses dados confirmam os achados de Li et al.¹⁰ Aventa-se a hipótese de que a CsA, inibindo a produção de IL-1 e bloqueando os receptores dessa interleucina nas células Th, induzirá bloqueio da atividade osteoclástica, facilitando a maior deposição óssea, como demonstraram *in vitro* Gowen & Mundy.⁸ Esses resultados são questionados por outros autores, como Ries et al.¹⁴ que sugeriram que a CsA estimularia a atividade osteoclástica.

Fu et al.^{6,7} usaram sobredoses de CsA em ratos para avaliar a remodelação óssea, verificando decréscimo na formação óssea, aventando-se a hipótese de a CsA inibir a proliferação de osteoblastos, as mitogêneses dessas células e os níveis de fosfatase alcalina, ocasionando aumento da atividade osteoclástica, resultando em uma maior e mais rápida reabsorção óssea. Porém, esses dados não podem ser considerados como padrões de normalidade, pois os efeitos colaterais com sobredoses exacerbam-se, imunossuprimindo excessivamente os animais.

Cox et al.³ apóiam o descrito anteriormente, demonstrando que a CsA inibe a perda óssea periodontal induzida por ligaduras em ratos, uma vez que

a IL-2, que reverteria esse efeito, também é inibida pela ação seletiva da CsA sobre o sistema imune. No presente trabalho, verificou-se que a perda óssea alveolar nos grupos III e IV, cujos ratos receberam ligadura e tratamento com CsA, ou vice-versa, foi estatisticamente semelhante, podendo-se sugerir que a CsA, quando administrada em doses adequadas, pode levar a uma inibição na osteoclasia e um aumento da proliferação de osteoblastos.^{22,10}

O grupo IV (tratamento com CsA + ligadura) não apresentou diferença estatística significativa em relação aos grupos que foram tratados com CsA (grupos V, VI e VII). Esses achados sugerem as mesmas hipóteses anteriormente descritas. Por serem os osteoblastos, os responsáveis por secretar componentes da matriz óssea, é possível que a CsA altere o potencial metabólico desses osteoblastos inibindo a secreção de fatores quimiotáticos para osteoclastos, resultando em um declínio no recrutamento e estimulação dos osteoclastos, embora o significado desses achados no desenvolver na formação óssea seja incerto.¹¹ Nota-se também, pelos mesmos autores, que *in vivo* o efeito nos osteoblastos é o resultado de uma complexa interação de ambos os efeitos primários mediados pela CsA e também os efeitos secundários que ocorrem como um resultado de alteração na remodelação óssea. Esses achados são importantes e devem ser mais estudados para que se possa entender melhor o que a CsA pode mediar em função de osteoblastos e osteoclastos.¹¹ O efeito da CsA sobre o osso alveolar ainda é incerto e precisa de atenção,¹⁵ pois vários autores sugeriram que a CsA pode inibir a reabsorção óssea *in vitro*, e também pode aumentar a remodelação óssea *in vivo*. Pacientes tratados com CsA, segundo Li et al.¹⁰ em associação com transplantes renais ou enxertos ósseos vascularizados, exibiram um aumento de parâmetros osteoblásticos e decréscimos de parâmetros osteoclásticos. Ainda assim, não há um consenso “forte” na literatura sobre o efeito da CsA no osso alveolar, em modelos animais ou em humanos, quando a droga é administrada em doses consideradas normais, uma vez que, no presente trabalho, os resultados dos grupos V, VI e VII (somente CsA) apresentaram perdas ósseas estatisticamente significantes em relação ao grupo I (controle), contrariando os resultados que seriam esperados nessas condições, o que demonstra mais uma vez que a atuação da CsA no mecanismo ósseo alveolar requer maior número de estudos.

Os grupos V, VI e VII foram realizados e tratados somente com CsA em períodos diferentes, apenas para a comparação dos resultados da CsA, uma vez que a CsA sofreu variação no período, nos demais grupos em que foi utilizada.

Logo, a imunossupressão, induzida pela CsA, diminuiu, em média, a intensidade de perda óssea alveolar, observada radiograficamente, em ratos

com doença periodontal induzida por ligadura. Diante do exposto, acreditamos que outros estudos se tornam necessários e deverão ser idealizados para a exploração de vários aspectos ainda não elucidados, sugerindo para trabalhos posteriores análises histológicas e histomorfométricas.

Conclusão

Os ratos imunossuprimidos com CsA apresentaram, em média, uma perda óssea alveolar, radiograficamente, menor do que os ratos apenas submetidos à colocação da ligadura, sugerindo a ação da CsA nesse mecanismo de perda óssea alveolar.

NASSAR, C. A. et al. Radiographic evaluation of the effect of cyclosporin A in the development of induced periodontal disease in rats. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.29, n.1-2, p.183-193, 2000.

- **ABSTRACT:** *CsA is a immunosuppressive drug widely used to prevent graft rejections in alogenic transplants. Gingival overgrowth is the main collateral effect observed on the oral cavity, however many doubts about its effect on the alveolar bone loss still remain. The objective of this work was to evaluate the effect of CsA on the alveolar bone loss in rats immunosuppressed with 10 mg/kg body weight/day and periodontal disease induced by ligature. The rats were separated in 7 groups: group I (control) – rats without ligature and without treatment with CsA; group II – presence of ligature; group III – presence of ligature and posterior treatment with CsA; group IV – treatment with CsA and posterior ligature; and groups V, VI and VII – rats treated only with CsA for 15, 30, and 45 days, respectively. The results showed, radiographically, a minor alveolar bone loss in the groups treated with CsA, comparing to the group where the rats were submitted only to ligature, but this bone loss was greater than that observed in the control group. So, the immunosuppression caused by CsA decreases, on the average, the intensity of the alveolar bone loss in rats with periodontal disease induced by ligature.*
- **KEYWORDS:** *Cyclosporin; alveolar bone; ligature; radiography; periodontal disease.*

Referências bibliográficas

- 1 AYANAGLOU, C. M. et al. Cyclosporin A-induced alterations of dentinogenesis in rat molars. *J. Oral Pathol. Med.*, v.26, p.129-34, 1997.
- 2 BUONPANE, E. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Conn. Med.*, v.54, p.17-9, 1990.
- 3 COX, D. S. et al. Role of interleukin-2 in periodontal bone loss in the ligated rat. *J. Periodontol.*, v.58, p.130, 1987.
- 4 DALEY, T. D. et al. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine induced gingival hyperplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.62, p.417-21, 1986.
- 5 FU, E. et al. Cyclosporin induced gingival overgrowth in rat: macroscopic and microscopic observations. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, v.16, p.279-91, 1996.
- 6 _____. Gingival overgrowth and dental alveolar alterations: possible mechanisms of cyclosporin-induced tooth migration. An experimental study in the rat. *J. Periodontol.*, v.68, p.1231-6, 1997.
- 7 _____. Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. *J. Periodontol.*, v.70, p.189-94, 1999.
- 8 GOWEN, M., MUNDY, G. R. Activity of recombinant interleukin 1, interleukin 2, interferon- γ on bone resorption *in vitro*. *J. Immunol.*, v.136, p.2478-82, 1986.
- 9 JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sulfhate administration on the periodontium of the rat. *J. Periodontal Res.*, v.10, p.332-45, 1975.
- 10 LI, X. Q. et al. Differential patterns of incorporation and remodeling among various types of bone grafts. *Acta Anat.*, v.140, p.236-44, 1991.
- 11 McCAULEY, L. K. et al. Effects of cyclosporin A on rat osteoblasts (RQS 17/2, 8 cells) *in vitro*. *Calcif. Tissue Int.*, v.51, p.291-7, 1992.
- 12 NAGATA, M. J. H. *Influência da ciclosporina-A e do tempo da terapêutica sobre o alotransplante dental realizado em duas etapas cirúrgicas. Estudo histológico em macacos*. Araçatuba, 1996. 125p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 13 RATEITSCHAK-PLUSS, E. M. et al. Inicial observation that cyclosporin A induces gingival enlargement in man. *J. Clin. Periodontol.*, v.10, p.237-46, 1983.
- 14 RIES, W. L. et al. Interleukin-2 stimulates osteoclastic activity: increased acid production and radioactive calcium release. *J. Periodontal Res.*, v.24, p.242-6, 1989.
- 15 SCHLOSBERG, M. et al. The effect of cyclosporin A administration and its withdrawal on bone mineral metabolism in rats. *Endocrinol.*, v.124, p.2179-84, 1989.

- 16 SOAMES, J. V., SOUTHAM, J. C. *Oral pathology*. 3.ed. Oxford: Medical Publications, 1998.
- 17 SPOLIDORIO, L. C. *Efeito da ciclosporina-A sobre o processo de reparo em tecido cutâneo de rato*. Piracicaba, 1991. 155p. Dissertação (Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas.
- 18 _____. *Aspectos morfométricos e estereométricos do aumento gengival induzido pela ciclosporina-A*. Piracicaba, 1996. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas.
- 19 STEWART, P. J. et al. Cyclosporine A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.*, v.1, p.285-91, 1986.
- 20 WASSEF, R. et al. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of rant of administration and dosage. *Transplant.*, v.40, p.489-93, 1985.
- 21 WILLIAMS, R. C. Periodontal disease. *New Engl. J. Med.*, v.331, p.322-73, 1990.
- 22 WILMINK, J. M. et al. Bone repair in cyclosporin – treated renal transplant patient. *Transplant. Proc.*, v.21, p.1492-4, 1989.