

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
FARMACOLOGIA

ESTUDO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO BISFOSFONATO
ALENDRONATO DISSÓDICO NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL

Adriana Magalhães Andrade de Menezes

Fortaleza – Ceará

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
FARMACOLOGIA

**ESTUDO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO
BISFOSFONATO ALENDRONATO DISSÓDICO NA DOENÇA
PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

Adriana Magalhães Andrade de Menezes

ORIENTADORA: Prof. Gerly Anne de Castro Brito

Fortaleza- Ceará

Outubro/2003

Aos meus pais, Braga e Marta, por tudo.

Ao meu marido, João Marcelo, pelo amor, paciência e companheirismo.

“A Sabedoria é radiante, não fenece, facilmente é contemplada por aqueles que a amam e se deixa encontrar por aqueles que a buscam. Ela mesmo se dá a conhecer aos que a desejam. Quem por ela madruga não se cansa: encontra-a sentada à porta. Meditá-la é a perfeição da inteligência; quem vigia por ela logo se isenta de preocupações; ela mesmo busca, em toda parte, os que a merecem; benigna, aborda-os pelos caminhos e a cada pensamento os precede” (Sab 6, 12-16)

AGRADECIMENTOS

À Professora Gerly Anne, por ter me orientado e incentivado com toda a presteza, dedicação e amizade na realização deste trabalho.

Ao Professor Ronaldo, por ter me acolhido em seu laboratório e pelo seu exemplo de competência e amor à pesquisa.

À Professora Cibele, do Setor de Microbiologia, pela sua decisiva colaboração e suas idéias no decorrer desta pesquisa.

Ao Professor Fernando Cunha e à Giuliana Bertozzi, da Faculdade de Ribeirão Preto – USP, pela gentileza na realização da dosagem de citocinas.

Ao Laboratório Merck Sharp & Domme, pela gentileza no fornecimento do medicamento usado neste trabalho.

À Hellíada Vasconcelos, pela valiosa ajuda neste trabalho.

Aos colegas de laboratório (LAFICA), pela agradável convivência e amizade.

À Vandinha, pela sua simpatia e atenção.

Ao José Ivan, pela sua boa vontade na confecção das lâminas histológicas.

À Dra. Artemísia pela atenção concedida às minhas solicitações no biotério.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, sempre dispostos a ajudar.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

AD	Alendronato dissódico
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
COX	Cicloxygenase
COX-2	Cicloxygenase-2
CMT	Tetraciclina quimicamente modificada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DX	Doxiciclina
DX5	Doxiciclina dose 5mg/kg
DX10	Doxiciclina dose 10 mg/kg
DPE	Doença periodontal experimental
EPM	Erro padrão da média
G	Gauge
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócito-macrófago
GNPA	Anaeróbios Gram-negativos pigmentados
HE	Hematoxilina-eosina
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenóico
HOCl	Ácido perclórico
HTAB	Tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio
ICAM	Molécula de adesão intercelular

IL-1	Interleucina-1
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
i.p.	intraperitoneal
IPO	Índice de perda óssea
kg	quilograma
M	Molar
mm	Milímetro
mg	Miligrama
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP-1	Metaloproteinases de matriz-1, tipo fibroblasto, colagenase-1
MMP-2	Metaloproteinases de matriz-2 ou gelatinase A
MMP-3	Metaloproteinases de matriz -3 ou "stromelysin"-1
MMP-7	Metaloproteinases de matriz-7 ou "matrilysin"
MMP-8	Metaloproteinases de matriz-8, tipo neutrofílico, colagenase-2
MMP-9	Metaloproteinases de matriz-9 ou gelatinase B
MMP-10	Metaloproteinases de matriz-10 ou "stromelysin"-2
MMP-11	Metaloproteinases de matriz-11 ou "stromelysin"-3
MMP-12	Metaloproteinases de matriz-12 ou metaloelastase
MMP-13	Metaloproteinases de matriz-13 ou colagenase-3
MMP-14	Metaloproteinases de matriz-14

MMP-15	Metaloproteinases de matriz-15
MMP-16	Metaloproteinases de matriz-16
MMP-17	Metaloproteinases de matriz-17
MMP-18	Metaloproteinases de matriz-13 ou colagenase-4
MMP-19	Metaloproteinases de matriz-19
MMP-20	Metaloproteinases de matriz-19 ou “enamelysin”
MT-MMP	Metaloproteinases de matriz tipo membrana
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	Fator nuclear- κ B
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada
PEA	Feniletil álcool
pg	picograma
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
Nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
OPD	o-fenilenediamina diidrocloreto
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
r.p.m.	Rotações por minuto
SAP	Complexo Strepto-avidina peroxidase

sp	Espécies
s.c.	Subcutânea
TIMP	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TIMP-1	Inibidores teciduais das metaloproteinases-1
TNF	Tumor de necrose tumoral
uPA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
°C	Graus Célsius
μl	microlitro
μg	micrograma

RESUMO

ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO BISFOSFONATO ALENDRONATO DISSÓDICO NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL – ADRIANA MAGALHÃES ANDRADE DE MENEZES.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia. Data da defesa: 10 de outubro de 2003. Orientador: Gerly Anne de Castro Brito.

A periodontite, a principal causa de perda de dentes em adultos, é uma doença inflamatória onde ocorre perda do osso alveolar e destruição das fibras do ligamento periodontal. Tanto as bactérias periodontopatogênicas como os fatores provenientes do hospedeiro são necessários para o desenvolvimento e progressão desta patologia. Os bisfosfonatos constituem uma nova classe de drogas, os quais inibem a reabsorção do osso causando alterações morfológicas ou apoptose nos osteoclastos. O objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos envolvidos no efeito de um bisfosfonato Alendronato Dissódico (AD) na doença periodontal experimental (DPE), comparando seus efeitos com a doxíciclina, tratamento já estabelecido. A DPE foi induzida passando-se fio de náilon 3.0 em torno do segundo molar superior esquerdo de ratos Wistar fêmeas, permanecendo durante 11d. AD (0,25mg/kg, s.c.) foi administrado 30 minutos antes e diariamente (tratamento preventivo) ou AD (0,25mg/kg, s.c.), DX (5 ou 10 mg/kg) ou salina (0,2ml) foram injetados a partir do 5º dia da indução da DPE (tratamento curativo). Os parâmetros avaliados foram: índice de perda óssea (IPO), análise histopatológica e microbiológica, imunohistoquímica, migração de neutrófilos, mieloperoxidase (MPO), leucogramas realizados antes e após a cirurgia (6h e 1, 7 e 11 dias) e variação da massa corpórea. No IPO, AD reduziu consideravelmente a reabsorção óssea tanto de forma preventiva como curativa sendo comparável à doxíciclina. Na análise histopatológica, o periodonto dos animais tratados com AD mostrou preservação do osso alveolar, cemento e das fibras colágenas, além de redução do infiltrado neutrofílico gengival de 6h. Esta inibição da migração neutrofílica foi confirmada através da MPO e em modelo de peritonite abdominal e o leucograma mostrou uma redução da neutrofilia. A imunohistoquímica mostrou que o AD diminuiu a marcação para TNF em 6h e 11d. No microbiológico, AD inibiu qualitativamente o crescimento de bactérias características da DP, tais como pigmentados e *Fusobacterium nucleatum*. AD promoveu um aumento na massa corpórea em relação ao grupo salina. Esses resultados mostram que o AD possui importante atividade na DPE, sugerindo a relevância de testes clínicos dos bisfosfonatos no tratamento da doença periodontal.

ABSTRACT

STUDY OF THE MECHANISMS INVOLVED IN EFFECT OF BISPHOSPHONATE DISSODIC ALENDRONATE IN EXPERIMENTAL PERIODONTAL DISEASE - ADRIANA MAGALHÃES ANDRADE DE MENEZES.

Dissertation submitted as a partial fulfillment of the requirement to degree of master's in Pharmacology to Graduation Pharmacology Course of the Physiology and pharmacology Department of the Medicine Faculty of the Ceará Federal University. Defense date: 2003, October 10. Professor: Gerly Anne de Castro Brito.

Periodontitis, the major cause of teeth loss in adults, is an inflammatory disease in which occurs alveolar bone resorption and collagen fibers destruction. Bacteria and host factors are necessary to the development of this pathology. Bisphosphonates are a new class of drugs that inhibit bone resorption by causing morphological alterations or death of osteoclasts. The objective of this study is to investigate the effect of the bisphosphonate Dissodic Alendronate (DA) in periodontitis, comparing it with the doxycycline (DX), treatment currently used. Periodontitis was induced by a nylon thread ligature surgically placed around the cervix of the second left maxillary molars of female Wistar rats. Animals were treated with DA (0.25 mg/kg, s.c.) 30 minutes before periodontitis induction and daily until sacrifice on 11th day (preventive group). Additionally, saline, DA or DX (5 or 10 mg/kg) were injected s.c. from 5th day and daily up to the 11th day of periodontal disease (curative treatment). The parameters analysed were alveolar bone loss (ABL), histopathologic and microbiological analysis, immunohistochemistry, myeloperoxidase (MPO), neutrophil migration, leukogram measured before and after challenge (6h and 1, 7 and 11 days) and body mass variation. DA, as curative or preventive treatment, reduced this alveolar bone loss similar DX. Histopathologically, the periodontium of animals treated with DA showed preservation of alveolar bone, cementum and collagen fibers of periodontal ligament, and reduced neutrophilic and mononuclear cell infiltrate. This effect on neutrophilic infiltrate was confirmed by MPO and in model of peritonitis induced by carrageenan. In immunohistochemistry, there was marked reduction of immunostaining for TNF in the group treated with DA compared to the saline group. In microbiologic analysis, DA inhibited the growth of bacteria involved in periodontitis. DA increased body mass compared to saline group. These results support clinical testing of bisphosphonates in the treatment of periodontal disease.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Periodonto.....	2
1.1. Desenho esquemático do dente com seu periodonto.....	4
2. Doença periodontal.....	5
2.1. Doença periodontal e colágeno.....	12
2.2. Doença periodontal e mieloperoxidase.....	15
3. Bisfosfonatos.....	17
3.1. Histórico.....	17
3.2. Estrutura química.....	18
3.3. Mecanismo de ação.....	20
3.4. Bisfosfonato e inflamação.....	22
3.5. Bisfosfonato e colágeno.....	24
3.6. Bisfosfonato e microrganismos.....	26
4. Tetraciclinas.....	27
5. Objetivos e justificativas.....	31
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
1. Animais.....	33

2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	33
3. Meios de cultura.....	35
4. Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes Utilizados.....	35
5. Tampões utilizados para o ensaio imunoenzimático.....	37
6. Protocolo experimental.....	38
6.1. Modelo de doença periodontal experimental.....	38
6.2. Grupos experimentais.....	41
6.2.1. Grupo normal.....	41
6.2.2. Grupo com doença periodontal experimental.....	41
6.2.3. Grupo tratado com alendronato dissódico (preventivo).....	41
6.2.4. Grupo tratado com alendronato dissódico (curativo).....	42
6.2.5. Grupo tratado com doxiciclina.....	42
6.2.6. Grupo tratado com alendronato dissódico + doxiciclina.....	42
6.3. Parâmetro avaliados.....	43
6.3.1. Análise da estrutura óssea alveolar.....	43
A. Estudo morfométrico do tecido ósseo na DPE.....	43
B. Análise histopatológica do osso alveolar.....	46
6.3.2. Análise Histopatológica da Gengiva.....	48
6.3.3. Imunohistoquímica para TNF.....	48
6.3.4. Dosagem de IL-1.....	49
6.3.5. Dosagem de mieloperoxidase.....	50
6.3.6. Análise microbiológica.....	51
6.3.7. Estudo hematológico.....	52

6.3.8. Análise da variação da massa corpórea.....	53
6.3.9. Migração de leucócitos em modelo de peritonite.....	53
7. Análise estatística.....	54
III. RESULTADOS.....	57
1. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) e da Doxiciclina (DX) sobre o tecido ósseo alveolar na DPE induzida por corpo estranho em ratas.....	58
2. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) e da Doxiciclina (DX) sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratas.....	63
2.1. Tabela dos escores histopatológicos.....	66
3. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) e da Doxiciclina (DX) sobre as alterações das fibras colágenas observadas na DPE em ratas.....	69
4. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre as alterações da gengiva de ratas submetidas a DPE.....	72
5. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a marcação de TNF pelo método de imunohistoquímica.....	75
6. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a produção de interleucina-1 (IL-1).....	79
7. Efeito do Alendronato Dissódico sobre o leucograma das ratas submetidas a DPE.....	80
8. Efeito da Doença Periodontal Experimental (DPE) sobre a dosagem de mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas.....	80
9. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a dosagem de mieloperoxidase em ratas após 6 horas da indução da DPE.....	80

10. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a migração de leucócitos em modelo de peritonite.....	85
11. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre as alterações microbiológicas em ratas submetidas a DPE.....	88
12. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a variação de massa corpórea de ratas submetidas a DPE induzidas por corpo estranho.....	94
IV. DISCUSSÃO.....	96
V. CONCLUSÕES.....	112
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

I. Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. PERIODONTO

O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente) compreende uma estrutura dinâmica, composta por gengiva (G), ligamento periodontal (LP), cemento radicular (C) e osso alveolar (AO) (Ilustração 1). É de fundamental importância para a inserção do dente no tecido ósseo da maxila e da mandíbula e manutenção da integridade da superfície da mucosa da cavidade oral. A estrutura e função dos tecidos que compõem o periodonto são mutuamente dependentes, mantendo entre si, uma harmoniosa relação sob condições normais (LINDHE; KARRING, 1999; HOLMSTRUP, 2001).

A gengiva é o elemento do periodonto que se sobrepõe ao osso alveolar e envolve toda a porção cervical do dente. Constitui o único dos tecidos periodontais que é diretamente visível à inspeção sob condições normais. Divide-se em gengiva marginal livre e gengiva inserida. A gengiva livre possui cor rósea, consistência firme e forma um pequeno sulco entre o tecido gengival e o dente (sulco gengival). Em continuidade a esta, há a gengiva inserida, a qual possui uma textura firme, aspecto de casca de laranja e estende-se em direção apical até a junção mucogengival, onde a gengiva funde-se com a mucosa oral. O tecido conjuntivo gengival é composto principalmente por densas redes de fibras colágenas que funcionam de forma interdependente, fornecendo firmeza à gengiva e, também, promovendo a inserção desta ao cemento e ao osso alveolar subjacente (HOLMSTRUP, 2001).

O ligamento periodontal é constituído de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, o qual é bastante vascularizado, contendo células, substância fundamental amorfa, nervos e ilhas epiteliais. As fibras colágenas do ligamento periodontal ligam o cemento radicular ao osso alveolar e situam-se no estreito espaço entre estes dois, promovendo, assim, a ancoragem do dente. O colágeno tipo I representa aproximadamente 80% do componente das fibras do ligamento periodontal. Além destas, existem também fibras elásticas, as quais estão incorporadas nas paredes dos vasos sanguíneos arteriais (LINDHE; KARRING, 1999; HOLMSTRUP, 2001).

O cemento radicular consiste em um tecido calcificado especializado que recobre a raiz dos dentes, cuja função é prender as fibras do ligamento periodontal à superfície radicular. Cerca de 50% do cemento é constituído por material orgânico, tais como proteoglicanas, glicoproteínas e colágenos, sendo que este último compreendendo a grande maioria. O cemento não contém vasos (sanguíneos e linfáticos) nem nervos, não sofre remodelação e reabsorção fisiológicas, contudo, sofre deposição contínua ao longo da vida (LINDHE; KARRING, 1999; HOLMSTRUP, 2001).

O processo alveolar é um tecido mineralizado inervado e vascularizado, compreendendo a parte da maxila e da mandíbula que proporciona suporte para as raízes dos dentes. Esses processos são dependentes da presença dos dentes e estão sujeitos à reabsorção quando a unidade dental é perdida. O osso alveolar está continuamente sofrendo remodelação como resultado de sua adaptação às necessidades funcionais (LINDHE; KARRING, 1999; HOLMSTRUP, 2001).

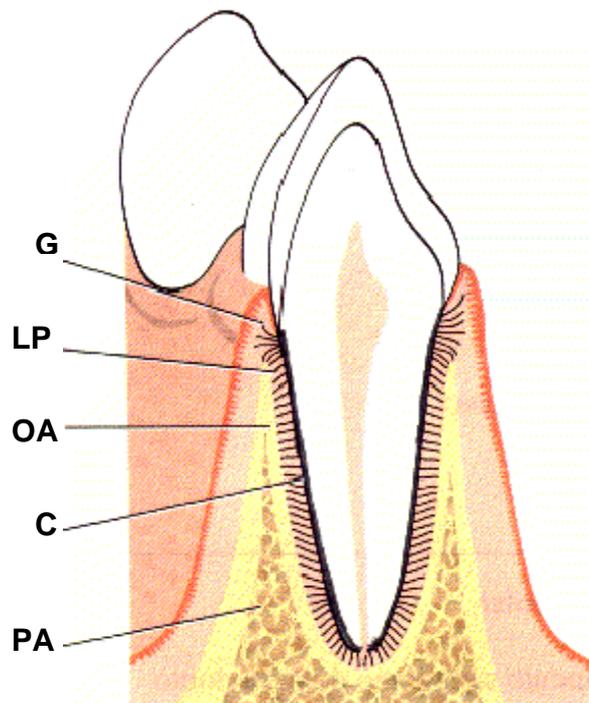


Ilustração 1: Desenho esquemático do dente com seu periodonto. G: gengiva; **LP:** ligamento periodontal; **C:** cemento radicular; **OA:** osso alveolar propriamente dito; **PA:** processo alveolar (fonte: LINDHE, 1999).

2. DOENÇA PERIODONTAL

Apesar da ênfase e da melhora na prática da higiene oral, a periodontite permanece a principal causa de perda de dentes em adultos. Com o aumento da expectativa de vida da população, espera-se um crescimento na prevalência e severidade da doença, já que o número de pessoas que cuidam e, conseqüentemente, conservam seus dentes naturais também tem se tornado cada vez maior (GOLUB et al, 1998).

Os microrganismos habitam a cavidade oral do ser humano desde o nascimento até a morte, colonizando todos os tecidos bucais, mineralizados ou não. A colonização bacteriana das superfícies dentárias forma a placa dental. Esta representa uma película de seres vivos os quais interagem entre si e com o meio bucal constituindo um biofilme. A deficiência da higiene oral leva a um aumento da quantidade de microrganismos no biofilme. Com isso, haverá mudanças nos fatores ecológicos locais, o que levará a alterações nos microrganismos e permitirá o aparecimento de novas espécies. Além das bactérias, outros microrganismos podem compor o biofilme, tais como fungos, protozoários e vírus. (RODRIGUES; NEWMAN, 2002).

Com o desenvolvimento da microbiota da placa, tanto o aumento da quantidade de bactérias já existentes como o aparecimento de novas espécies, levam a alterações inflamatórias começam manifestar-se clinicamente, caracterizando a gengivite. Quando o processo inflamatório progride em direção ao ligamento periodontal, ocorrendo perda do osso alveolar e destruição das fibras

do próprio ligamento periodontal com formação de bolsas periodontais, este processo é denominado periodontite (RODRIGUES; NEWMAN, 2002).

A maior parte das pessoas, mesmo periodontalmente saudáveis, podem formar placa dental que é composta de aproximadamente 75% de bactérias gram-positivas facultativas, enquanto que a periodontite está associada a uma placa cuja composição é caracterizada por bactérias gram-negativas e anaeróbicas (MORENO et al, 1999; TANNER; TAUBMAN, 1999; RODRIGUES; NEWMAN, 2002). Moreno et al (1999) observou que as bactérias mais freqüentemente encontradas em pacientes com periodontite eram anaeróbios Gram-negativos pigmentados (GNPA), *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces* sp. Entre os GNPA, *Prevotella* sp. existe em maior proporção que *Porphyromonas* sp. As principais bactérias relacionadas com a periodontite estão descritas na tabela 1.

Espécies predominantes associadas à periodontite

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Bacteróides forsythus</i>	<i>Prevotella intermédia</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>
Espécies <i>Eubacterium</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
Espécies <i>Treponema</i>	

Tabela 1: Principais patógenos envolvidos com a periodontite (fonte: KORNMAN, 2001).

Até a década de 70, pensava-se que apenas as bactérias existentes na placa e seus produtos mediavam a destruição tecidual existente na doença periodontal. Atualmente, sabe-se que as bactérias são agentes essenciais, porém apenas sua presença não é suficiente. São necessários fatores provenientes do hospedeiro para o desenvolvimento e progressão desta patologia (PAGE; SCHROEDER, 1981; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000; KORNMAN, 2001).

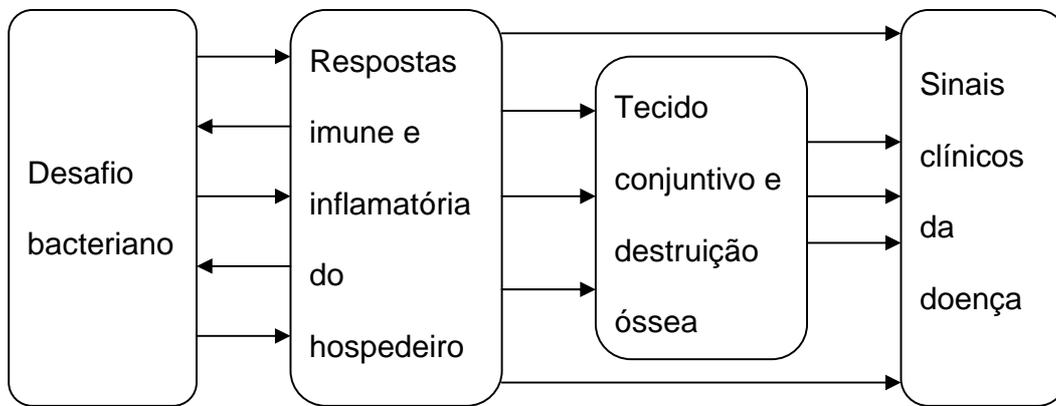


Ilustração 2: Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais são definidos pela resposta do hospedeiro perante o desafio bacteriano (fonte: KORNMAN, 2001).

As bactérias desenvolvem mecanismos a fim de escapar ou neutralizar a resposta imune do hospedeiro, dentre os quais podemos citar enzimas, toxinas, componentes da parede celular e metabólitos (GETKA et al, 1996). Contudo, a permanência de patógenos e seus produtos nos tecidos bucais do hospedeiro desencadearão resposta do hospedeiro (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000), a qual tem o potencial de limitar, assim como agravar a doença periodontal (KLAUSEN, 1991; GOLUB et al, 1998).

O evento inicial da resposta do hospedeiro corresponde ao recrutamento e migração de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) para o local da infecção periodontal. Os neutrófilos são importantes na proteção do periodonto contra certas infecções bacterianas. Estas células, além de realizarem fagocitose, liberam substâncias inflamatórias e antibacterianas capazes de eliminar os microrganismos, tais como lisozima, lactoferrina, fosfatase alcalina, hidrolases ácidas, proteínas catiônicas e, também, mieloperoxidase (MPO) (ÖVER et al, 1993; BRETZ, 1996; MIYASAKI; NEMIROVSKIY, 1997). Contudo, a liberação das enzimas lisossomais e também de radicais de oxigênio durante este processo bactericida, pode promover destruição tecidual (LIU et al, 2001). PMN também foi capaz de produzir citocinas, tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) (GALBRAITH et al, 1997).

A infiltração dos PMN e sua ativação nos tecidos inflamados são mediadas por quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas, entre estas IL-8, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM -1), IL-1 β e TNF. Em contrapartida, os neutrófilos ativados podem produzir mais destes mediadores levando a uma auto-amplificação do recrutamento e da ativação dos PMN, perpetuando a resposta inflamatória e a destruição tecidual. Estas citocinas (IL-8, IL-1 β e TNF) são consideradas pró-inflamatórias (LIU et al, 2001).

As citocinas são proteínas solúveis, as quais transmitem informações de uma célula a outra através de mecanismos autócrinos ou parácrinos. Em geral, as citocinas atuam objetivando a eliminação de microrganismos parasitas e promovendo a reparação do dano tecidual (GENCO, 1992). Contudo, as citocinas

pró-inflamatórias desencadeiam eventos de sinalização intracelular e comportamentos celulares catabólicos através de ligações específicas a seus receptores (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). As citocinas desempenham importante papel na patogênese da doença periodontal (GALBRAITH et al, 1997).

As principais citocinas envolvidas na periodontite são a IL-1 e TNF, as quais atuam direta e sinergisticamente estimulando a degradação da matriz de tecido conjuntivo, ativação dos osteoclastos e a reabsorção óssea (KJELDSEN et al, 1995; LIU et al, 2001; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Estas citocinas compartilham muitas propriedades biológicas em virtude de estimularem mensageiros intracelulares semelhantes, mesmo por diferentes mecanismos, ativando a mesma cascata de metabolismo intracelular (KOBAYASHI et al, 1999).

A IL-1 é uma citocina sintetizada predominantemente pelos macrófagos e linfócitos, contudo, pode ser produzida por outras células, tais como neutrófilos, fibroblastos, ceratinócitos e células epiteliais. A IL-1 desempenha um importante papel na patogênese da doença periodontal destrutiva (ALEXANDER et al, 1996; KOBAYASHI et al, 1999). Esta citocina induz a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) e de metaloproteinases, contribuindo, assim, para a perpetuação da degradação do tecido conjuntivo e da reabsorção óssea (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). A IL-1 também promove a ativação de linfócitos T, proliferação de linfócitos B e estimulação da produção de anticorpos, modulação da função da célula endotelial, o qual inclui a liberação de fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF), prostaciclina (PGI₂) e síntese do fator ativador de plaquetas (PAF) (PREISS; MEYLE, 1994). A IL-1 consiste de pelo menos dois subtipos, IL-1 α e IL-1 β , os quais têm homologia

limitada ao nível de peptídeos e nucleotídeos, mas possuem atividade biológica comum e, também, ligam-se aos mesmos receptores celulares (KOBAYASHI et al, 1999).

TNF é uma proteína trimérica, secretada por monócitos e macrófagos, a qual desempenha um papel fundamental na doença periodontal (ROSSOMANDO; WHITE, 1993; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; SANDROS et al, 2000). TNF está presente tanto no sulco gengival, como também nos tecidos gengivais inflamados. Este achado sustenta a hipótese de que citocinas, tais como TNF, poderiam representar uma ponte entre o processo inflamatório e a destruição tecidual (ROSSOMANDO; WHITE, 1993). Para tal, mostrou-se que TNF induz à reabsorção da cartilagem e do osso, através da secreção de colagenase pelos fibroblastos (ROSSOMANDO et al, 1990; ROSSOMANDO; WHITE, 1993; SANDROS et al, 2000). Recentemente nosso laboratório demonstrou a importância do TNF na doença periodontal experimental, através de estudos com inibidores da síntese de TNF (clorpromazina, pentoxifilina e talidomida), mostrando que estes reduziram de forma significativa o índice de perda óssea, as alterações histológicas e a leucocitose 11 dias após a indução da doença (LIMA et al, 2000; LIMA et al, 2003). Experimentos *in vitro* mostraram que esta citocina também é capaz de modular a função dos leucócitos polimorfonucleares (MEYLE, 1993).

Contudo, Fredriksson et al (2002) encontraram uma menor liberação *in vitro* de TNF por neutrófilos periféricos em pacientes com periodontite em comparação a pacientes saudáveis, sem a doença. Rossomando et al (1990) também mostraram existir uma relação inversa entre a presença da inflamação gengival e TNF.

Os metabólitos do ácido araquidônico são importantes mediadores inflamatórios e desempenham papel fundamental na doença periodontal. Estes metabólitos incluem uma variedade de compostos derivados dos ácidos graxos que são enzimaticamente produzidos, através da ação da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase, e liberados em resposta à lesão tecidual local. Como exemplo destes metabólitos, podemos citar prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI₂), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e outros ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETE) (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

Os metabólitos do ácido araquidônico têm sido considerados os principais mediadores catabólicos da doença periodontal desde que eles são potentes estimuladores da reabsorção óssea, estão presentes nos tecidos gengivais e estão elevados em indivíduos com esta patologia (BEZERRA et al, 2000; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). A eficácia dos AINEs no tratamento da doença periodontal está associada à inibição dos metabólitos do ácido araquidônico (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Lohinai et al (2001) mostraram um aumento significativo nos níveis de PGE₂ bem como na expressão da isoforma COX-2 durante a doença periodontal experimental em relação ao grupo sem a doença. Em nosso laboratório, Bezerra et al (2000) observaram que a inibição da COX, promovida por fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), foi capaz de prevenir a perda óssea alveolar na doença periodontal experimental.

O óxido nítrico (NO), outro mediador inflamatório, também aparece na cascata inflamatória que ocorre na doença periodontal. O NO é um radical livre com importantes funções fisiológicas em baixa concentração. Contudo, em resposta a um estímulo inflamatório, são sintetizadas altas concentrações de NO,

as quais são citotóxicas para bactérias, fungos, protozoários e células tumorais. Essas altas concentrações de NO também produzem efeitos prejudiciais ao próprio hospedeiro, tais como dano ao DNA, peroxidação lipídica, dano protéico e estimulação da liberação de citocinas inflamatórias (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Também em nosso laboratório, foi demonstrada uma participação do NO na doença periodontal experimental (DPE) em ratos e que, no entanto, gel contendo NO em altas concentrações era capaz de inibir a reabsorção óssea induzida pela DPE (LEITÃO, 2002).

A determinação da presença de produtos inflamatórios no fluido gengival é de grande valia na avaliação do estado da doença periodontal e, com isso, do resultado esperado após a terapia (ALEXANDER et al, 1996).

2.1. Doença periodontal e colágeno

O colágeno constitui a proteína estrutural básica de todos os tecidos periodontais, compreendendo cerca de 60% das proteínas da gengiva e do ligamento periodontal e mais de 90% da matriz orgânica do osso alveolar (GOLUB et al, 1985).

As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de enzimas proteolíticas, as quais promovem a degradação de macromoléculas que compõem a matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos. Estas enzimas são secretadas na forma latente e tornam-se ativas no meio pericelular através da clivagem da ligação Zn^{+2} -cisteína. Esta ligação bloqueia a reatividade do sítio ativo da enzima. (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

Estas enzimas estão envolvidas em vários eventos fisiológicos, tais como involução do útero após o parto, desenvolvimento embrionário, remodelação tecidual, erupção dental, entre outros. Porém, as MMPs também participam de processos patológicos, entre os quais podemos citar doença periodontal, artrite, aterosclerose, enfisema pulmonar e osteoporose (RYAN; GOLUB, 2000).

As MMP são divididas em quatro grupos dependendo do seu substrato e da homologia da seqüência, os quais são: colagenases (tipo fibroblasto ou MMP-1, tipo neutrofílico ou MMP-8, colagenase-3 ou MMP-13 e colagenase-4 ou MMP-18); gelatinases (A ou MMP-2 e B ou MMP-9); “stromelysin” (-1 ou MMP-3, -2 ou MMP-10, -3 ou MMP-11 e “matrilysin” ou MMP-7); e MT-MMPs (MMP tipo membrana, tais como MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17 e MT1-MMP). Metaloelastase (MMP-12), MMP-19 e MMP-20 (“enamelysin”) também fazem parte da grande família das MMP (DAHAN et al, 2001).

As metaloproteinases são produzidas por várias células, dentre as quais encontram-se os osteoclastos e, também, os osteoblastos. O osteoblasto pode iniciar a reabsorção óssea através da síntese de proteinases, incluindo MMPs, as quais vão degradar o osteóide. A liberação destes produtos da degradação e a liberação de mediadores biológicos pelos osteoblastos, tais como osteocalcina e citocinas, vão promover a migração dos osteoclastos (LLAVANERAS et al, 2001). Estes sofrem polarização, com o desenvolvimento de uma área especializada na membrana destas células, a qual é responsável pela fixação destas células à superfície óssea, iniciando, assim, sua reabsorção (MUNDY, 1991).

As MMP desempenham papel crítico na destruição dos tecidos de suporte da estrutura dentária. A MMP-8 (colagenase do tipo neutrofílico ou colagenase-2) é o tipo predominante na periodontite (TERONEN et al, 1997).

A presença da MMP-8 ativada no fluido gengival é uma característica marcante da doença periodontal. A principal origem desta colagenase é a partir de neutrófilos desgranulados e extravasados, os quais estão presentes na gengiva inflamada. Atualmente, sabe-se que a transcrição de MMP-8 também pode ocorrer através de células mesenquimais de linhagem não-neutrofílica, como, por exemplo, de fibroblastos do ligamento periodontal e da gengiva, indicando a habilidade destas células mesenquimais em produzir MMP-8 (TERONEN et al, 1997).

Além da MMP-8, também são encontrados outros tipos de metaloproteinases nos tecidos periodontais, tais como MMP-1 e MMP-3. Mostrou-se que a MMP-3 ("stromelysin"-1) é capaz de degradar numerosos substratos da matriz extracelular, incluindo colágeno tipo IV e IX. Além disso, MMP-3 exerce uma ação indireta através da ativação da MMP-1, que é uma colagenase própria dos mamíferos (NAKAYA et al, 2000).

A IL-1 β é um mediador inflamatório importante associado com a doença periodontal. Assim, tanto MMP-1 como MMP-3 encontram-se aumentados no ligamento periodontal em resposta a estimulação por IL-1 β (NAKAYA et al, 2000).

A regulação intrínseca da atividade das MMPs envolve uma família de proteínas denominada inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP). Estas

proteínas possuem ampla distribuição nos tecidos e nos fluidos corporais e são eficazes no bloqueio da atividade das MMPs (NAKAYA et al, 2000).

De modo particular, TIMP-1 inibe de forma eficiente a atividade da colagenase. O inibidor forma complexos com a molécula da colagenase ativa, atuando como inibidor competitivo da enzima e, talvez, limitando o início da cascata colagenolítica (NAKAYA et al, 2000).

Tanto as células residentes da gengiva como os fibroblastos do ligamento periodontal produzem colagenases que estão envolvidas com a fisiologia tecidual. Colagenase tipo fibroblasto (MMP-1) e seu RNAm têm sido detectados no fluido e no tecido gengival, respectivamente, de pacientes com periodontite, contudo, é responsável principalmente pelo *turnover* tecidual normal e não pela degradação patológica (RYAN; GOLUB, 2000).

2.2. Doença periodontal e mieloperoxidase

A importância dos mecanismos de defesa do hospedeiro na doença periodontal já está bem estabelecida. O acúmulo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos no local da lesão constitui um dos estágios mais importantes da proteção do organismo. Os neutrófilos possuem um papel primordial, pois eles representam a primeira linha de defesa contra o ataque microbiano (ÖVER et al, 1993).

A mieloperoxidase (MPO) está presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e é considerada uma enzima antibacteriana devido às espécies reativas geradas a partir do sistema MPO-H₂O₂-haletto (BRADLEY et al, 1982; ÖVER et al, 1993; YAMALIK et al, 2000). Över et al (1993) sugere que esta

enzima é eficaz na eliminação de *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* e do microrganismo periodontopatogênico *Actinobacillus actinomycescomitans*.

Porém, a MPO também está envolvida na patogênese da doença periodontal, tendo uma contribuição na atividade das proteases. A MPO promove a ativação das proteases através da inibição das antiproteases. Ácido perclórico (HOCl) , produto de uma reação catalizada por MPO, inativa o inibidor α_1 -protease pela oxidação do resíduo metionina, o qual é essencial para a ação deste inibidor . Com isso, são criadas condições favoráveis para a maioria das proteases. A ativação das proteases latentes e a inibição das antiproteases alteram o equilíbrio proteases/antiprotease, sendo este um importante passo para a ruptura do tecido conjuntivo (YAMALIK et al, 2000).

Como a MPO é encontrada primariamente nos grânulos neutrofílicos, ela pode ser considerada um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido. Ocorrendo aumento no número dos PMN nos tecidos periodontais, quando estes se encontram inflamados, haverá, conseqüentemente, uma elevação na atividade das MPO. Foi demonstrado que a atividade da MPO é significativamente menor após terapia periodontal ou em pacientes sem comprometimento destes tecidos (CAO; SMITH, 1989; ÖVER et al, 1993).

Pelo fato da MPO poder ser detectada tanto enzimaticamente como espectrofotometricamente com certa facilidade, ela pode ser usada no diagnóstico clínico da doença periodontal (ÖVER et al, 1993; MIYASAKI & NEMIROVSKIY, 1997).

3. BISFOSFONATOS

3.1. Histórico

Em 1865, químicos alemães sintetizaram o primeiro protótipo dos bisfosfonatos. Porém, foi em 1897 que o primeiro bisfosfonato, o etidronato, foi sintetizado (FLEISCH, 2000).

Os bisfosfonatos constituem uma nova classe de drogas estruturalmente semelhantes aos pirofosfatos. Estes últimos são produtos normais do metabolismo ósseo humano podendo estarem presentes no soro e na urina (TENENBAUM et al, 2002).

A descoberta dos bisfosfonatos foi baseada em estudos com pirofosfatos inorgânicos por Fleisch e colaboradores. Estes pesquisadores mostraram que o pirofosfato (P - O - P) ligava-se fortemente ao fosfato de cálcio e inibia tanto a formação dos cristais de fosfato de cálcio como sua dissolução *in vitro*. Porém, nenhum efeito era observado na reabsorção óssea *in vivo*, provavelmente devido à falta de estabilidade do pirofosfato *in vivo*, o qual sofria rapidamente hidrólise em sua ligação P - O - P. Surgiu, então, a necessidade de uma droga análoga ao pirofosfato, com propriedades físico-químicas semelhantes a este, contudo resistente à hidrólise enzimática: os bisfosfonatos (LIN, 1996; FLEISCH, 2000; TENENBAUM et al, 2002).

3.2. Estrutura química

Os bisfosfonatos possuem duas ligações químicas C - P, localizadas no mesmo átomo de carbono, resultando em uma estrutura P - C - P (HIRAGA et al, 1996; FLEISCH, 2000). Assim, os bisfosfonatos tornaram-se completamente resistentes à hidrólise enzimática, sendo extremamente estáveis. Essa estrutura permite uma grande quantidade de variações possíveis tanto por alteração das duas cadeias laterais do átomo de carbono, como pela esterificação do grupo fosfato (EZRA; GOLOMB, 2000; FLEISCH, 2000; TENEMBAUM et al, 2002). (Ilustração 3)

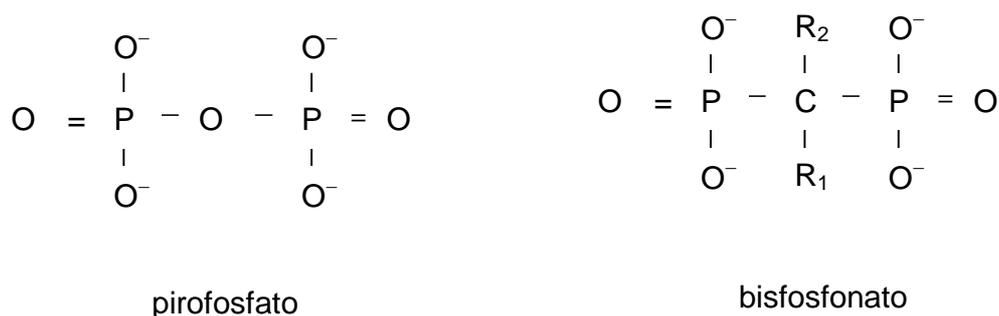


Ilustração 3: Estrutura química do pirofosfato e do bisfosfonato

A ligação ao osso mineral é intensificada pela inclusão de um grupo hidroxil em R1. A configuração de R2 determinará os efeitos celulares dos bisfosfonatos e sua eficácia como inibidor da reabsorção óssea (TENEMBAUM et al, 2002).

Como família, todos os bisfosfonatos possuem propriedades físico-químicas semelhantes. Porém, a capacidade de inibir a reabsorção óssea

diferencia substancialmente entre eles. Esta atividade é consideravelmente aumentada quando da existência de um grupo amino na cadeia do carbono alifático. Podemos citar como exemplo o alendronato, o qual é um aminobisfosfonato e apresenta-se 700 vezes mais potente que o etidronato, tanto *in vitro* como *in vivo* (LIN, 1996). (Ilustração 4)

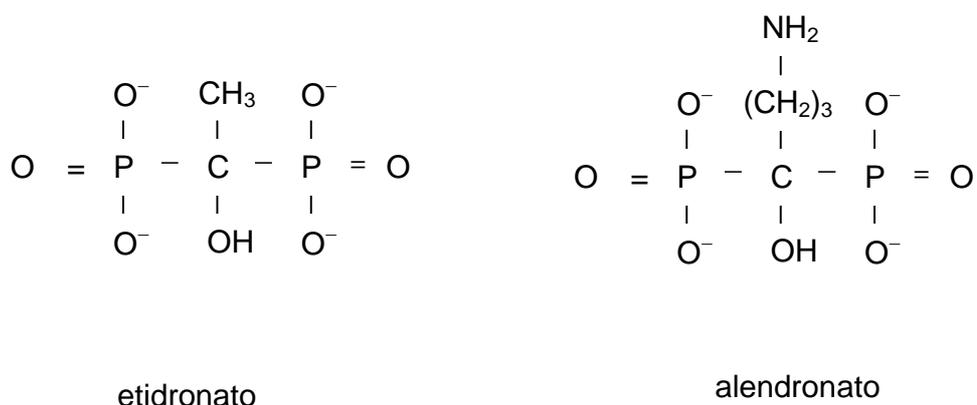


Ilustração 4: Estrutura química de dois bisfosfonatos: etidronato e alendronato (aminobisfosfonato)

Os bisfosfonatos constituem uma classe de drogas que, como os pirofosfatos, ligam-se avidamente ao osso. Devido a esta propriedade, acrescida de sua habilidade em afetar o metabolismo ósseo, estas drogas têm sido usadas em diversas doenças ósseas e do metabolismo do cálcio, tais como osteoporose, doença de Paget, neoplasias malignas com metástase óssea, entre outras (FLEISCH, 2000; SHIBUTANI et al, 2000; EVANS, 2002; HU et al, 2002).

3.3. Mecanismo de ação

A afinidade dos bisfosfonatos à hidroxiapatita do osso constitui a base para seu uso como inibidores da reabsorção óssea e da calcificação ectópica (EZRA; GOLOMB, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que a inibição da reabsorção óssea era mediada pelos efeitos físico-químicos dos bisfosfonatos através da inibição da formação, agregação e dissolução dos cristais de fosfatos de cálcio. Sabe-se, atualmente, que os bisfosfonatos agem por meio de mecanismos celulares (FLEISCH, 2000).

Segundo Fleisch (2000) o mecanismo de ação dos bisfosfonatos compreende três níveis, os quais são estreitamente interligados:

- A nível tecidual, seu principal efeito é a diminuição do *turnover* ósseo. Isso ocorre devido a uma diminuição do número e da atividade dos osteoclastos, os quais estão implicados na reabsorção óssea;
- A nível celular, os bisfosfonatos agem através da inibição do recrutamento, da adesão e da atividade dos osteoclastos. Também diminuem a vida útil destas células, através da indução de apoptose (ITO et al, 1999; FLEISCH, 2000), o que leva a uma diminuição no número de osteoclastos, fato normalmente observado após tratamento com bisfosfonatos;
- A nível molecular, a baixa concentração necessária para sua atividade sugere que os bisfosfonatos amplificam o mecanismo de transdução celular.

Os bisfosfonatos podem influenciar os osteoclastos de forma direta ou indireta. Os efeitos diretos ocorrem devido à captação do fármaco pelos osteoclastos. Vários são os efeitos diretos dos bisfosfonatos nestas células, entre eles destacamos o fato destas drogas alterarem a morfologia dos osteoclastos, inclusive com a interrupção da formação da borda pregueada. Estes fármacos também podem agir de forma indireta por meio de outras células, como por exemplo, os osteoblastos. Os bisfosfonatos induzem os osteoblastos a sintetizarem inibidores do recrutamento dos osteoclastos, inibindo, assim, a reabsorção óssea (FLEISCH, 2000).

Além dos mecanismos supracitados, Tenenbaum et al (2002) acrescentam a estes o fato dos bisfosfonatos estimularem a produção de fatores inibitórios de osteoclastos e a prevenção do desenvolvimento dos osteoclastos a partir de precursores hematopoiéticos.

O bisfosfonato alendronato também promoveu uma elevação nos níveis de cálcio intracelular em uma linhagem de células semelhantes a osteoclastos. Este achado sugere a presença de receptores para bisfosfonatos nos osteoclastos (TENEMBAUM et al, 2002).

Os bisfosfonatos que contêm um grupamento amina, denominados de aminobisfosfonatos, tais como alendronato, pamidronato e ibandronato, também inibem a via do mevanolato (a qual é responsável pela produção de colesterol e lipídeo isoprenóide), mais especificamente inibe a enzima “farnesyl pyrophosphate synthase” em osteoclastos. Esta inibição resulta em déficit da prenilação protéica e, nos mamíferos, esta parece ser a principal razão para a inibição da função dos

osteoclastos e a apoptose secundária promovida pelos aminobisfosfonatos (FRITH et al, 2001; MONTALVETTI et al, 2001; TÖYRÄS et al, 2003).

3.4. Bisfosfonato e inflamação

Pesquisas mostram que vários bisfosfonatos diferem nos seus efeitos e propriedades farmacológicas no processo inflamatório (MÖNKKÖNEN et al, 1998).

Alguns bisfosfonatos, tais como clodronato, etidronato e tiludronato, inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF) e óxido nítrico pelos macrófagos, possuindo, assim, atividade antiinflamatória *in vivo* (MAKKONEN et al, 1995; MÖNKKÖNEN; MAKKONEN, 1995; MÖNKKÖNEN et al, 1998).

O clodronato inibiu a produção tanto de IL-6 como do TNF por macrófagos *in vitro*. O efeito do clodronato foi intensificado quando este era encapsulado em lipossomos. A explicação para isto está no fato de que o clodronato como droga livre não entra prontamente nas células, enquanto que a droga em lipossomos é absorvida através da endocitose dos lipossomos, resultando em uma ação inibitória mais potente. Este efeito antiinflamatório sugere o uso deste bisfosfonato em doença inflamatória crônica, especialmente na artrite reumatóide (MÖNKKÖNEN, 1994)

Os aminobisfosfonatos atuam de forma contrária ao grupo anterior. Eles sensibilizam os macrófagos a intensificarem a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF), podendo causar uma resposta de fase aguda,

febre transitória e artromialgia em mais de 50% dos pacientes quando a droga é ingerida pela primeira vez. A razão para a ocorrência destes efeitos colaterais ainda não é clara, mas provavelmente envolve a secreção de citocinas por macrófagos e monócitos. (MÖNKKÖNEN; MAKKONEN, 1995; MÖNKKÖNEN et al, 1998; TÖYRÄS et al, 2003).

Os metabólitos do clodronato e do tiludronato participam das ações antiinflamatórias destes fármacos, em contraste com os aminobisfosfonatos, os quais não são metabolizados. O clodronato é metabolizado em um análogo tóxico do ATP, sendo este metabólito responsável pelo efeito inibitório sobre a liberação de citocinas. (MÖNKKÖNEN et al, 1998; FRITH et al, 2001; TÖYRÄS et al, 2003). Este efeito é mediado pela inibição do fator nuclear- κ B (NF- κ B), o qual regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação e na resposta de fase aguda. O alendronato, por sua vez, intensifica a ligação de NF- κ B ao DNA, promovendo, com isso, a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TÖYRÄS et al, 2003).

Makkonen et al (1995) observaram que o pamidronato inibiu a produção de NO *in vitro* por macrófagos. Porém, este efeito foi atribuído à toxicidade deste fármaco.

O efeito do tiludronato e do pamidronato no crescimento de macrófagos foi analisado por Mönkkönen et al (1998). Observou-se que o pamidronato, assim como outros aminobisfosfonatos, é um inibidor do crescimento de macrófagos mais potente quando comparado a bisfosfonatos sem o grupamento amina. Töyräs et al (2003) também mostrou o efeito do alendronato na diminuição do crescimento de macrófagos *in vitro*.

Contudo, Lissoni et al (1996) observou que a infusão de pamidronato pode induzir a uma rápida, porém transitória, diminuição da concentração de IL-6 no sangue de pacientes com metástase óssea devido ao tumor sólido. De acordo com Ebersole e Cappelli (2000), a IL-6 é uma citocina pleiotrópica envolvida na regulação da resposta imune, na resposta de fase aguda e na hematopoiese.

3.5. Bisfosfonato e colágeno

Na doença periodontal, pelo fato das MMP promoverem destruição proteolítica tecidual, drogas com atividade anticolagenolítica, tais como as tetraciclina e os bisfosfonatos, têm sido estudadas (GOLUB et al, 1983; TERONEN et al, 1997).

Relatos anteriores mostram que o bisfosfonato tiludronato inibe de forma concentração-dependente a atividade das MMP-1 e MMP-3 em cultura de células do ligamento periodontal humano, porém este efeito ocorre sem alteração do RNAm para estas enzimas (NAKAYA et al, 2000). Então, propôs-se que os bisfosfonatos atuam através da quelatação dos cátions (Ca^{+2} e Zn^{+2}) das MMPs, já que na ausência de Ca^{+2} as MMPs são completamente inativas (TERONEN et al, 1997; NAGAYA et al, 2000).

Estudo feito por Llavanas et al (2001) mostrou que o uso do clodronato promove uma ligeira inibição das gelatinases, ao passo que reduz consideravelmente os níveis de collagenases ativas. Estas observações indicam que este bisfosfonato simplesmente interage e inibe as MMPs ativas, mas não diminui a sua expressão.

Teronen et al (1997) demonstraram o potencial anticolagenolítico do clodronato sobre MMP-8 de forma dose-dependente tanto *in vitro* como *in vivo*. A inibição da enzima foi vista em exsudato inflamatório humano do fluido gengival em tampão contendo concentrações fisiológicas de cálcio e zinco, indicando que, seja qual for o mecanismo de ação do clodronato, este também exerceria sua ação *in vivo*.

O clodronato inibiu MMP-8 e também MMP-1 em exsudato inflamatório humano. Assim, sugeriu-se que esta droga pode ser usada, tanto localmente como sistemicamente, no tratamento de várias doenças que possuem excessiva atividade colagenolítica (TENOREN et al, 1995).

Garnero et al (2001) observaram que um potente bisfosfonato heterocíclico de 3ª geração denominado zoledronato diminuiu de forma direta a degradação do colágeno tipo II em pacientes com doença de Paget. O colágeno tipo II, colágeno das cartilagens, é degradado por metaloproteinases, incluindo MMP-1, -2, -3, -7 e -13. Com isso, o autor sugere que os bisfosfonatos possuem efeito condroprotetor em humanos.

Tenoren et al (1997) mostrou que pamidronato e alendronato podem, em doses terapêuticas, inibir MMP-13 (colagenase-3 humana recombinante), MMP-3 ("stromelysin"-1) e MMP-1 (colagenase-1 tipo fibroblasto).

Clodronato, alendronato, pamidronato e zoledronato, em concentrações terapêuticas e não-citotóxicas, foram capazes de inibir MMP-3, -12, -13 e -20 e, também, -1, -2, -8, -9, mas não inibiram o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), que é uma proteinase e ativador pro-MMP. Assim, os

bisfosfonatos foram considerados inibidores de MMPs de amplo espectro (HEIKKILA et al, 2002).

No entanto, o efeito dos bisfosfonatos como agente inibidor da destruição do colágeno nos tecidos periodontais ainda foi pouco estudado.

3.6. Bisfosfonato e microrganismos

Alguns fármacos que normalmente são usados em patologias não infecciosas têm mostrado alguma atividade antimicrobiana *in vitro*. Essas drogas são denominadas “não-antibióticos”. Recentemente foi demonstrado que entre estas drogas, encontram-se os bisfosfonatos (KRUSZEWSKA et al, 2002).

O alendronato inibe *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa in vitro*, porém não é eficaz para *Candida albicans* e *Escherichia coli* (KRUSZEWSKA et al, 2002). Além disso, este fármaco como também outros aminobisfosfonatos, parecem ser ativos, tanto *in vivo* como *in vitro*, contra o protozoário *Trypanossoma cruzi*, em concentrações que não exercem toxicidade nas células do hospedeiro (MONTALVETTI et al, 2001).

Alguns bisfosfonatos foram eficazes em inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*. Esta inibição parece ser devido a quelação do Mg^{+2} e pode ser revertida através da adição de Mg^{+2} ou por outros cátions divalentes (HSU et al, 1995).

Çiftçioğlu et al (2002) mostraram que etidronato e clodronato inibiram completamente, de forma bactericida, o crescimento de uma nanobactéria, a qual foi recentemente descoberta em rins de pacientes com doença renal policística.

Além disso, os bisfosfonatos também podem eliminar as células cancerosas, através da inibição das metaloproteinases, que são enzimas também encontradas nos microrganismos.

4. TETRACICLINAS

Descobertas em 1948, as tetraciclina surgiram a partir da fermentação de uma bactéria do solo denominada *Streptomyces aureofaciens*, originando o composto clortetraciclina, a qual foi a primeira tetraciclina a ser completamente caracterizada tanto química como clinicamente (NELSON, 1998). Desde então, outros fármacos foram surgindo, os quais compartilhavam semelhanças na sua estrutura molecular e no seu espectro de ação, tais como oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina, entre outras (CIANCIO, 1976).

Estes medicamentos representam um grupo de antibióticos que possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo efetivos contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive aquelas que são encontradas na cavidade oral (CIANCIO, 1976; KAPUSNIK-UNER et al, 1996). As tetraciclina são fármacos bacteriostáticos, atuando diretamente através da inibição da síntese protéica bacteriana ao ligarem-se ao ribossomo 30S da bactéria (NELSON, 1998; KAPUSNIK-UNER et al, 1996; RYAN & ASHLEY, 1998) e, de forma indireta, promovendo uma alteração na membrana celular das bactérias, interferindo no movimento de cálcio para dentro e para fora da célula bacteriana, afetando, assim, os eventos moleculares (RYAN; ASHLEY, 1998).

Pesquisadores e clínicos mostraram que a doença periodontal tem respondido bem à terapia antimicrobiana. A razão para o uso destes fármacos é o fato de que os microrganismos representam o agente causal desta patologia. Vários antimicrobianos têm sido propostos conforme a susceptibilidade das bactérias orais (GENCO, 1981).

De acordo com Genco (1981) o antibiótico metronidazol mostrou-se efetivo contra anaeróbios, mas não demonstrou efeito contra bactérias facultativas, tais como *Eikenella corrodens*, *Actinomyces*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e espécie *Capnocytophaga*. A penicilina parece ter ação contra a maioria das bactérias associadas com a periodontite, com exceção de algumas cepas de *Actinomyces*, as quais são resistentes a este fármaco. No entanto, a tetraciclina mostrou-se efetiva contra os principais microrganismos periodontopatogênicos conhecidos atualmente, dentre os quais podemos citar *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas melaninogenicus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*, espiroquetas e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

As tetraciclinas têm sido usadas como coadjuvantes no tratamento das doenças periodontais (KORNMAN; KARL, 1982; GOLUB et al, 1987; GOLUB et al, 2001), devido a sua capacidade de suprimir microrganismos, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que são periodontopatogênicos (GENCO 1981; KORNMAN; KARL, 1982; GOLUB et al, 1987; GOLUB et al, 1994) e, também, pelo fato de que a concentração da droga ativa no fluido gengival alcança níveis bem maiores quando comparados àqueles encontrados no sangue (GENCO, 1981; GOLUB et al, 1987). De forma vantajosa

sobre os outros antimicrobianos, a tetraciclina se liga à superfície radicular, sendo liberada lentamente, prolongando, assim, seu efeito antimicrobiano (GOLUB et al, 1994; CATON et al, 2001).

Entretanto, Golub e colaboradores (1983) descobriram um outro mecanismo de ação das tetraciclinas independente de sua ação antimicrobiana, que é a capacidade de inibir a atividade das metaloproteinases (MMP) em dose menor que aquela necessária para a ação antimicrobiana, atividade que foi confirmada posteriormente por outros autores (GOLUB et al, 1983; GOLUB et al, 1987; INGMAN, T, 1993; GOLUB et al, 1994; VERNILLO et al, 1994; POURTAGHI, 1996; CIANCIO, 1998; THOMAS et al, 1998; CATON et al, 2001). CIANCIO, 1998, mostrou que a administração sistêmica de doses subantimicrobianas de doxiciclina (20 mg), juntamente com procedimentos de raspagem, alisamento e polimento radicular, promovia resultados significativamente melhores em relação à profundidade de sondagem, sangramento a sondagem, nível do ligamento periodontal e redução da perda óssea alveolar, quando comparados a pacientes que receberam apenas a terapia mecânica.

A descoberta desse novo mecanismo de ação das tetraciclinas foi de grande importância para a terapia periodontal, pois quando usadas em doses subantimicrobianas evita o risco de promover resistência bacteriana e minimiza os efeitos colaterais gastrintestinais normalmente relacionados ao seu uso prolongado (GOLUB et al, 1994; GOLUB et al, 2001; BEZERRA et al, 2002). Isto acontece pois o nível sérico máximo da droga está reduzido em cerca de 90% quando comparado ao nível das doses antimicrobianas (GOLUB et al, 1994).

Além da diminuição das bactérias periodontais e também da atividade das MMPs na gengiva, as tetraciclinas podem reduzir a ativação das pro-MMPs, prevenir a degradação do inibidor endógeno das MMPs (TIMP-1) e, também, do inibidor da α_1 -proteinases (α_1 -antitripsina) (GOLUB et al, 1994; POURTAGHI, 1996; RYAN; ASHLEY, 1998) e, também, inibir a reabsorção óssea através de uma ação direta na função dos osteoclastos (GOLUB et al, 1998).

Apesar das tetraciclinas inibirem a atividade das MMP, estas drogas não alteram a inflamação induzida pelos microrganismos (GOLUB et al, 2001). Porém, alguns estudos mostram que estes fármacos possuem propriedades antiinflamatórias, as quais não estão relacionadas com seu efeito antimicrobiano, mas com a habilidade em inibir a atividade da proteína quinase C e das MMPs, como também de modular as células (neutrófilos) e os mediadores inflamatórios, tais como radicais de oxigênio, ácidos araquidônico, PGE₂ e óxido nítrico (NO) (D'AGOSTINO et al, 2001).

5. Objetivos e justificativas

As medicações sistêmicas são de grande valor na terapia periodontal. Vários benefícios têm sido associados a estas, tais como redução da profundidade de sondagem, recuperação do ligamento periodontal, redução dos patógenos periodontais e diminuição da necessidade de cirurgia periodontal (CIANCIO, 2002).

Os fármacos usados sistemicamente podem ser divididos em dois grandes grupos: o primeiro, contendo medicamentos que atuam nos patógenos periodontais e; o segundo, com medicações capazes de modular a resposta do hospedeiro (CIANCIO, 2002).

Alguns trabalhos mostram que os bisfosfonatos, quando usados em modelo de doença periodontal, diminuem de forma significativa a perda óssea alveolar, diminuindo, conseqüentemente, a perda dentária (BRUNSVOLD et al, 1992; REDDY et al, 1995; MITSUTA et al, 2002; ALENCAR et al, 2002). Porém, o exato mecanismo pelo qual estas drogas atuam, ainda não está totalmente esclarecido. Além disso, a maioria dos trabalhos acima utilizaram os bisfosfonatos de forma preventiva.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos na ação do bisfosfonato alendronato, de forma preventiva e curativa, no modelo de periodontite experimental em ratos, desenvolvido por vários autores (CRAWFORD et al, 1978; SALLAY et al, 1992; SAMEJIMA et al, 1990; KOIDE et al, 1995) e modificado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA (BEZERRA et al, 2000; LIMA et al, 2000).

II. Materiais e Métodos

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com massa corpórea entre 150 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidas para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 6 animais por gaiola. Todos receberam água e alimentação *ad libitum* e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

O protocolo experimental foi realizado de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Conselho da Sociedade de Psicologia Americana (1980) para o uso de animais experimentais.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC; no Laboratório de Anaeróbios, Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC; e, no Laboratório do Professor Fernando Cunha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

Durante o curso dos experimentos, foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos, os quais são citados a seguir:

- Balança digital eletrônica para pesagem dos animais - Filizola;
- Balança analítica (Analytical Standard - Ohaus®);
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm²);
- Centrífuga (Centrifuge 5804R – Eppendorf);
- Citocentrífuga Cito-Ciclo (Revan®);
- Cuba de ultra-som (Thornton);
- Envelopes geradores de anaerobiose (Anaerogen™ – Oxoid);
- Escala de McFarland (Probac);
- Espectrofotômetro (Spectronic®20 Genesys);
- Estufa bacteriológica 37°C;
- Fio de náilon para sutura - 3.0;
- Geladeira e freezer (-70°C);
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.)
- Jarra de anaerobiose (Oxoid);
- Micropipetas automáticas;
- Microscópio óptico binocular;
- Micrótomo (Olympus);
- Milli-Q (Millipore);
- Ultra Turrax T8.10 (IKA Labortechnik);
- Vortex.

3. Meios de Cultura

- BHI - Brain Heart Infusion (Ágar) - DIFCO

Suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e com hemina/menadione.

- BHI - Brain Heart Infusion - DIFCO

Suplementado com hemina/menadione.

- PEA – Feniletil álcool (Agar) - DIFCO

Suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e com hemina/menadione.

4. Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes Utilizados

- Alendronato dissódico: comprimidos de 70 mg - Fosamax® (Merck Sharp & Dohme);
- Doxiciclina: comprimidos de 100 mg - Vibramicina® (Pfizer);
- Carragenina;
- Heparina 5.000 UI/ml (Roche);
- Anticorpo para TNF primário e secundário (Endogen);
- Anticorpo anti-IL1 β (S5/B3);
- Anticorpo biotilado anti-IL1 β (S329/B4);

- Albumina bovina 1%;
- Avidina-peroxidase (DAKO);
- Ácido nítrico 7%;
- Água destilada;
- Álcool etílico 70%;
- Cloral hidratado 10%;
- Complexo Strepto-avidina peroxidase (SAP);
- Complexo DAB;
- Diidrocloreto de O-dianisidina;
- Éter sulfúrico;
- Formaldeído 40%;
- Líquido de Turk (diluidor para contagem total de células):

Ácido acético glacial P.A.....	20,0 ml
Violeta de genciana.....	2,0 ml
Água destilada.....	1000 ml

- Peróxido de hidrogênio 1%;
- PBS;
- o-fenilenediamina diidrocloreto – dissolvido no tampão substrato descrito no protocolo de ELISA;
- Tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio (HTAB);
- Tampão fosfato de potássio;
- Tampão citrato;

- Tween 20;
- Soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,15M);
- Soro normal de carneiro;
- Sulfato de sódio 5%;
- Xilol;
- Azul de metileno 1%;
- Azul de anilina;
- Ácido fosfotungstico;
- Corante Rápido - HEMA 3®;
- Eosina;
- Fucsina ácida;
- Hematoxilina;
- Hematoxilina de Harris;
- Orange G.

Alendronato dissódico (AD) foi diluído em água destilada e Doxiciclina (DX) em solução salina 0,9%.

5. Tampões utilizados para o ensaio imunoenzimático

- Tampão bicarbonato pH 8.2

NaHCO₃ P.A. (Merck, Sharp and Dohme – MSD, USA).....0,1M

NaCl P.A. (Merck, Sharp and Dohme – MSD, USA).....0,1M

- Tampão Substrato

Ácido Cítrico34,7mM

Na₂HPO₄ (Merck).....66,7mM

- Substrato

OPD.....0,4mg

H₂O₂.....0,4μl

Tampão substrato q.s.p.1 ml

- Tampão de lavagem PBS-tween 20, 0,1% v/v.

6. Protocolo Experimental

6.1. Modelo de Doença Periodontal Experimental

Utilizou-se o modelo da Doença Periodontal Experimental (DPE), desenvolvido por vários autores (CRAWFORD et al., 1978; SALLAY et al., 1982; SAMEJIMA et al., 1990; KOIDE et al.,1995) e modificado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia

e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC (BEZERRA et al., 2000; LIMA et al., 2000).

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (400 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Procedeu-se à indução da Doença Periodontal Experimental (DPE) através da inserção cirúrgica de um fio de sutura de náilon (3.0) ao redor do segundo molar superior esquerdo. Previamente à passagem do fio, utilizou-se uma guia nos espaços interproximais mesial e distal do dente supracitado, a fim de facilitar a colocação do fio. Este era adaptado de modo que o nó cirúrgico ficasse voltado para a face vestibular da boca do animal. Após 11 dias, sacrificava-se o animal através de deslocamento cervical, sendo tal procedimento precedido por anestesia em câmara de éter (Ilustração 5).

O dia escolhido para o sacrifício foi baseado em estudos prévios realizado no LAFICA, os quais constataram destruição total do processo alveolar e destruição importante do cemento no 11º dia de experimento (LIMA et al., 2000).

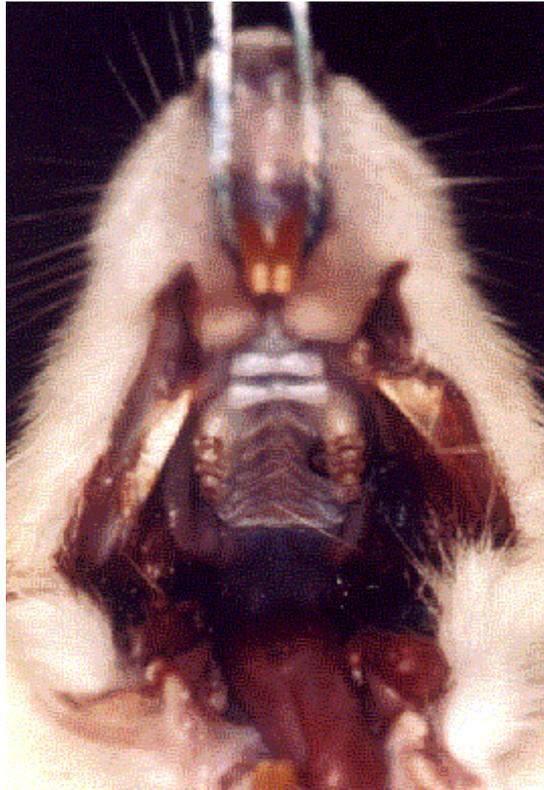


Ilustração 5: Indução da Doença Periodontal Experimental (DPE). A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de náilon (3.0) em torno do segundo molar superior esquerdo, permanecendo por 11 dias.

6.2. Grupos Experimentais

Foram utilizados duzentos e treze animais durante o decorrer desse estudo, os quais foram divididos nos diversos grupos experimentais a seguir:

6.2.1. Grupo normal (*naive*)

Esse grupo foi constituído por 6 animais, que não foram submetidos à Doença Periodontal Experimental (DPE), a fim de verificar a existência de alguma alteração nos parâmetros analisados entre as duas hemiarcadas superiores.

6.2.2. Grupo com Doença Periodontal Experimental (Salina)

Esse grupo foi constituído por animais submetidos à doença periodontal experimental. Os animais receberam injeções de solução salina a 0,9% (0,2 ml; via subcutânea - s.c.) 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia ou a partir do 5º dia da indução da DPE até o 11º dia, sendo, então, sacrificados.

6.2.3. Grupo Tratado com Alendronato Dissódico (Preventivo)

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam Alendronato Dissódico (Fosamax®) na dose de 0.25 mg/kg (de acordo com estudos prévios do

LAFICA), administradas por via subcutânea 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia até o 11º dia, quando ocorreu o sacrifício.

6.2.4. Grupo Tratado com Alendronato Dissódico (Curativo)

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam Alendronato Dissódico (Fosamax®) na dose de 0.25 mg/kg , administradas por via subcutânea, diariamente, a partir do 5º dia da indução da DPE, sendo sacrificados no 11º dia.

6.2.5. Grupo Tratado com Doxiciclina

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam Doxiciclina (Vibramicina®) nas doses de 5 e 10 mg/kg (de acordo com estudos prévios do LAFICA), administradas por via subcutânea (s.c.), diariamente a partir do 5º dia após a cirurgia até o 11º dia.

6.2.6. Grupo Tratado com Alendronato Dissódico + Doxiciclina

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam Alendronato Dissódico (0.25 mg/kg), seguido da aplicação simultânea de Doxiciclina (5mg/kg) administradas por via subcutânea (s.c.) diariamente a partir do 5º dia após a cirurgia até o 11º dia.

6.3. Parâmetros Avaliados

6.3.1. Análise da Estrutura Óssea Alveolar

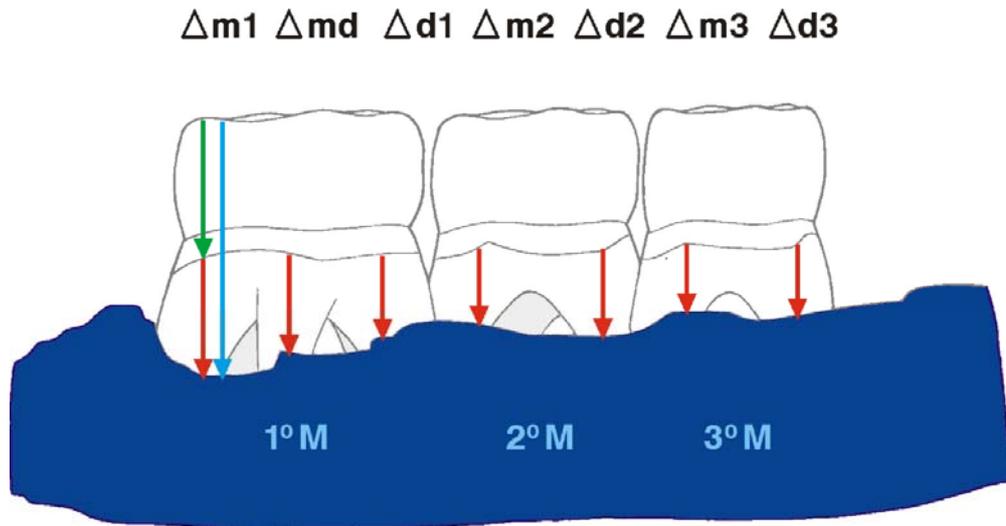
Para o estudo da estrutura óssea alveolar na doença periodontal experimental, foram realizadas análises morfométrica e histopatológica. As hemiarcadas contralaterais, ou seja, sem doença periodontal foram utilizadas como controle.

A. Estudo Morfométrico do Tecido Ósseo na DPE

Os animais foram sacrificados no 11º dia após o procedimento cirúrgico. Suas maxilas foram removidas e fixadas no formol a 10%, durante 24 horas. Após esse período, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas (direita e esquerda), dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, a fim de distinguir o tecido ósseo dos dentes, os quais coram-se com menos intensidade. Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram acomodadas com massa de modelar em lâminas para posterior observação em microscópio óptico munido de ocular graduada (aumento de 4x). As medidas foram feitas em sete pontos diferentes, nas faces vestibulares dos três dentes molares: três no primeiro molar, visto que esse dente possui três raízes, denominadas mesial (m1), média (md) e distal (d1); dois pontos nos segundo (m2 e d2) e terceiro (m3 e d3) molares, respectivamente (CRAWFORD et al., 1978). As diferenças ou variações (Δ) foram obtidas a partir das medidas das hemiarcadas com DPE, subtraídas

daquelas realizadas nas hemiarcadas contralaterais (controle) (SAMEJIMA et al., 1990). A soma das sete variações corresponde ao índice de perda óssea (IPO), expresso em mm (CRAWFORD et al., 1978) (Ilustração 6)

Índice de Perda Óssea



$$\text{IPO (mm)} = (\Delta m1 + \Delta md + \Delta d1) + (\Delta m2 + \Delta d2) + (\Delta m3 + \Delta d3)$$

Ilustração 6: Desenho esquemático das medidas da reabsorção óssea: as diferenças (setas vermelhas, Δ) foram obtidas a partir das medidas feitas nas hemiarcadas com DPE (seta azul), subtraídas daquelas realizadas nas hemiarcadas contralaterais (seta verde, controle). A soma das sete variações correspondeu ao índice de perda óssea (IPO), expresso em mm.

B. Análise Histopatológica do Osso Alveolar

As análises histopatológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada. Decorridos 11 dias após o procedimento cirúrgico (colocação do fio de náilon), os animais foram sacrificados e suas hemiarcadas, removidas. Estas foram fixadas em formol a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas a tratamento com ácido nítrico a 7%, por aproximadamente 5 dias, para a desmineralização. A seguir, as hemiarcadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 5 μ m em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas pelos métodos HE e Tricrômio de Mallory.

Para a análise microscópica da hemiarcada com a coloração HE, foi considerada a região entre os 1º e 2º molares, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular, além do estado de preservação do processo alveolar e cimento. Tais achados foram classificados de acordo com os escores padronizados no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer - LAFICA, citados no quadro a seguir:

Escore 0:	<p>Infiltrado celular ausente ou discreto;</p> <p>Escassos ou raros osteoclastos;</p> <p>Processo alveolar preservados;</p> <p>Cimento preservado.</p>
Escore 1:	<p>Infiltrado celular moderado;</p> <p>Presença de alguns osteoclastos;</p> <p>Pequena reabsorção do processo alveolar;</p> <p>Cimento preservado.</p>
Escore 2:	<p>Infiltrado celular acentuado;</p> <p>Presença de grande número de osteoclastos;</p> <p>Processo alveolar com digestão acentuada;</p> <p>Destruição parcial do cimento.</p>
Escore 3:	<p>Infiltrado inflamatório acentuado;</p> <p>Processo alveolar ausente;</p> <p>Destruição acentuada do cimento.</p>

Para análise microscópica da hemiarcada pela coloração Tricrômio de Mallory, também foi considerada a região entre os 1º e 2º molares, sendo avaliada

a existência de fibras colágenas de forma qualitativa, além de sua direção e continuidade.

6.3.2. Análise Histopatológica da Gengiva

Após 6 horas ou 11 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados. Realizou-se a remoção da gengiva vestibular da região dos molares superiores esquerdos e fixação da mesma em formol a 10% por 24 horas. A seguir, a gengiva foi processada e incluída em parafina. Então, foram feitos cortes a 5µm em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas pelo método HE para análise mais detalhada do infiltrado inflamatório.

6.3.3. Imunohistoquímica para TNF

Para a realização da imunohistoquímica, foi usada a gengiva vestibular da região de molares superiores esquerdos de modo igual ao usado na metodologia descrita no item anterior. Os cortes histológicos são colocados em lâminas especiais as quais são recobertas com poli-L-lisina ou gelatina.

Inicialmente, as lâminas foram deixadas em estufa a 66-88°C durante 3 horas. Após este tempo, estas são mergulhadas em xilol aquecido por 10 min e, depois, em álcool. Logo em seguida, as lâminas foram colocadas em recipiente contendo tampão citrato pH 6,0 em microondas por 15 min. Após o esfriamento

das mesmas, elas foram introduzidas em peroxidase 3% durante 15 min. Então, as lâminas foram incubadas em anticorpo primário “overnight”.

Decorrido este tempo, banhou-se as lâminas em PBS para depois serem incubadas no anticorpo secundário. Após 30 min, houve uma nova incubação no complexo Strepto-avidina peroxidase (SAP). Após esta etapa, incubou-se com DAB, para em seguida, fazer uma contra-coloração com hematoxilina de Harris.

6.3.4. Dosagem de IL-1

Após 6 horas do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados. Realizou-se a remoção da gengiva vestibular da região dos molares superiores esquerdos e congelados a -70°C . No dia da análise, o material estocado foi descongelado, homogeneizado em Tampão inibidor de Protease . O sobrenadante foi removido para quantificação da citocina IL-1 β por ELISA.

Inicialmente, o sobrenadante foi incubado em placa de 96 poços, com 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti IL-1 β (S5/B3) (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2; 100 $\mu\text{l/poço}$) por 16-24h a 4°C . Então, lavou-se a placa com PBS-tween20, para em seguida realizar o bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem durante 2h à temperatura ambiente. Após a lavagem da placa, esta foi incubada com a curva padrão de IL-1 β (2000-1,95 pg/ml) diluída em tampão de lavagem juntamente com as amostras a serem dosadas durante 16-24h a 4°C . Novamente, lavou-se a placa e esta foi incubada com anticorpo biotilado anti-IL-1 β (S329/B4) (anticorpo de detecção) diluído

1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Nova lavagem da placa. Então, realizou-se nova incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem (100µl/poço) por 15 min à temperatura ambiente. Novamente, lavou-se a placa, para em seguida incubá-la com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato (100µl/poço). A placa foi coberta e colocada no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente. A reação foi parada com 150µl/poço de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490nm. Os resultados são expressos em µg/ml como a curva padrão.

6.3.5. Dosagem de Mieloperoxidase

A medida de MPO foi avaliada de acordo com o método de Kaplow descrito por Bradley et al, 1982.

Utilizou-se a gengiva da região de molares superiores para a dosagem de MPO. As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio (HTAB). Neste momento, congelam-se as amostras. Em seguida, mais tampão HTAB é adicionado a fim de compor 400 µl de tampão para 15 mg de tecido. Realiza-se nova homogeneização. Então, centrifugou-se as amostras a 4.500 r.p.m. por 12 minutos. Terminada a centrifugação, 0,1 ml do sobrenadante é removido e a este é adicionado 2 ml da solução de o-dianisidina, tampão fosfato de sódio, peróxido de hidrogênio e água destilada. Esta mistura é colocada em um espectrofotômetro a fim de medir a absorbância em 460 nm nos

tempos 0, 30 segundos, 1,3 e 5 minutos. Uma unidade de MPO equivale a uma mudança na absorvância de $1,13 \times 10^{-2}$ nm. Com os tempos acima descritos, foi feito uma curva e foi escolhido o tempo 1 minuto como mais representativo do evento.

6.3.6. Análise Microbiológica

Realizou-se a análise microbiológica de animais normais (grupo naive) e de animais que foram submetidos a DPE e que receberam 0,2 ml de salina (grupo DPE) ou AD (0,25 mg/kg - grupo DPE+AD). Após o sacrifício dos animais, a gengiva da região de molares superiores esquerdos foi coletada, colocada assepticamente em 0,3 ml em meio de cultura líquido (Brain Heart Infusion – BHI/DIFCO) e transportada imediatamente para o setor de Microbiologia. O fragmento coletado foi colocado em placa estéril e com lâmina de bisturi estéril homogeneizou-se o tecido. O espécime clínico foi semeado com alça bacteriológica em meio de cultura sólido (Brain Heart Infusion agar - BHI ágar) e em placa de feniletíl álcool ágar (PEA). Os meios foram incubados em atmosfera de anaerobiose por 7 dias a 37°C. Para a obtenção da atmosfera de anaerobiose foram utilizadas jarras (OXOID) e envelope gerador de anaerobiose (OXOID) (Ilustração 7). Após o período de incubação do crescimento bacteriano, foi realizado bacterioscopia pelo método de Gram e teste tipo respiratório. O teste tipo respiratório consiste em semear a colônia bacteriana em meio de cultura sólido e incubar em diferentes atmosferas de incubação (anaerobiose,

microaerofilia e em atmosfera convencional) para caracterização da bactéria como anaeróbia estrita, aeróbia estrita ou anaeróbia facultativa (KONEMAN et al, 2001).

Com a finalidade de verificar a ação inibitória do AD sobre as bactérias da doença periodontal, foi isolado *Peptostreptococcus* sp. de um rato com DPE. Em seguida, foram separados dois tubos de ensaio contendo BHI e em cada tubo foi inoculado 0,6 ml de uma cultura recente (24h) de *Peptostreptococcus* sp. O primeiro tubo continha apenas o meio de cultura líquido (BHI), o qual foi denominado tubo controle. No segundo tubo, além do meio de cultura, havia 28 mg/ml de AD (tubo teste). Os tubos foram incubados em atmosfera convencional por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura, a qual foi feita por inspeção visual, comparando a turvação dos tubos inoculados com a turvação da escala McFarland (Ilustração 8). A partir do crescimento destas bactérias em meio líquido, foi feita bacterioscopia pelo método de Gram e repicado em placa com ágar-sangue.

6.3.7. Estudo Hematológico

Animais foram anestesiados utilizando-se uma câmara de éter. Em seguida, a ponta da cauda do animal foi cortada com uma tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e a seguinte colhida a fim de confeccionar o esfregaço corado pelo corante rápido (HEMA-3®), para a realização das contagens diferenciais. Adicionalmente, 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de Líquido de Turk, para a contagem do número total de leucócitos, utilizando-se a câmara de

Neubauer. Logo após, os animais tiveram suas caudas cauterizadas, com o objetivo de evitar infecções. Os hemogramas foram realizados imediatamente antes da cirurgia, 6 e 24 horas após e nos 7° e 11° dias pós-cirúrgicos.

6.3.8. Análise da Variação da Massa Corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corpóreas medidas antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante os 11 dias do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (mg) em relação à massa inicial.

6.3.9. Migração de leucócitos em modelo de peritonite

Os animais foram pré-tratados com Alendronato Dissódico (0,25 mg/kg) ou salina (0,2 ml) por via subcutânea (s.c.) 30 minutos antes da injeção de 1 ml do estímulo inflamatório Carragenina (300 µg/ml, i.p.). Após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a fim de avaliar a migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, para a cavidade peritoneal.

Em seguida, a cavidade peritoneal foi lavada com 10 ml de solução de PBS contendo 0,1 ml de heparina. Os abdomens dos animais foram agitados levemente, expostos e foram coletados cerca de 6 ml de fluido de lavagem com pipeta Pasteur.

Do exsudato colhido, 20 μ l foram diluídos em 380 μ l de líquido de Turk (diluição 1:20) e usados para contagem total de células em câmara de Neubauer.

Para contagem diferencial das células, foram utilizados 25 μ l do exsudato restante na preparação dos esfregaços, em citocentrífuga, a 1000 r.p.m., durante 10 min, sendo estes corados pelo corante rápido HEMA -3. As células foram examinadas em microscópio óptico através de objetiva de imersão em óleo (aumento 100x), onde foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-se em 4 tipos: neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e mononucleares. O número de neutrófilos foi estimado multiplicando-se o percentual encontrado destas células (contagem diferencial) pelo número total de leucócitos (contagem total), dividido por 100. Os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de neutrófilos/ml do lavado peritoneal e comparados àqueles obtidos dos animais que foram injetados com salina estéril.

7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Para comparações entre os grupos foram utilizados: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni.

Nas análises histopatológicas, os dados obtidos foram expressos como mediana e o teste estatístico aplicado foi o de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância de pelo menos $p < 0,05$.

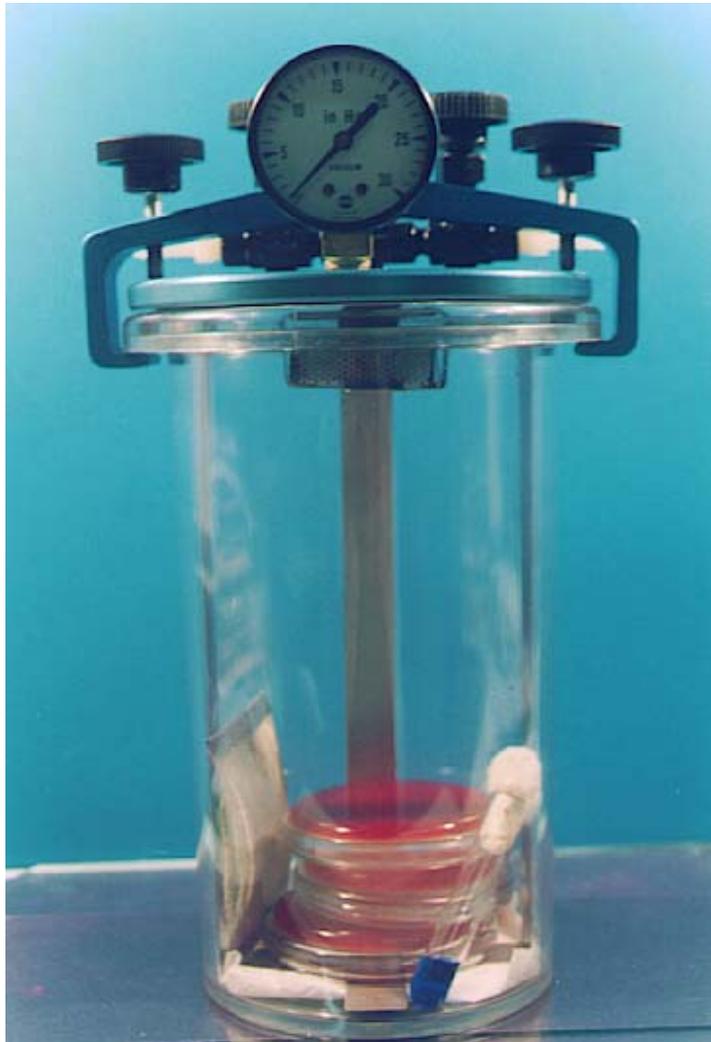


Ilustração 7: Jarra (OXOID). A jarra é utilizada juntamente com envelope gerador de atmosfera adequada para a obtenção de anaerobiose.

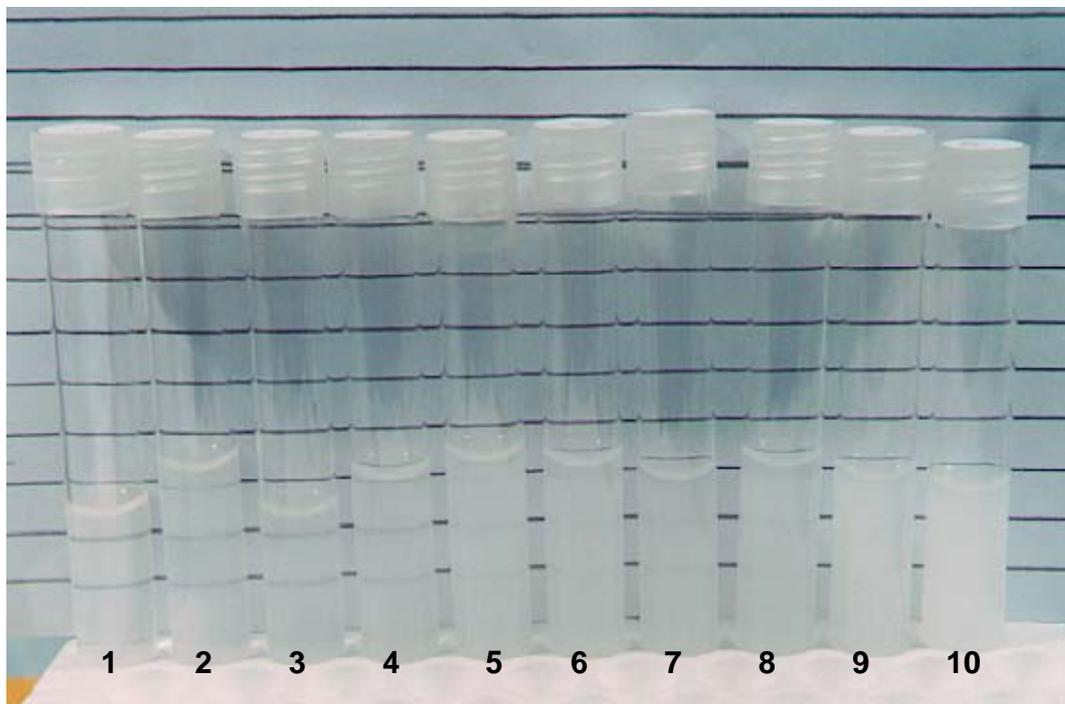


Ilustração 8: Escala McFarland. Nesta escala, observam-se as diferentes turvações equivalentes a concentrações bacterianas/ml, de acordo com a tabela abaixo:

Tubo	Concentração bacteriana/ml	Tubo	Concentração bacteriana /ml
1	3×10^8	6	18×10^8
2	6×10^8	7	21×10^8
3	9×10^8	8	24×10^8
4	12×10^8	9	27×10^8
5	15×10^8	10	30×10^8

III. Resultados

III. RESULTADOS

1. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) e da Doxíciclina (DX) sobre o tecido ósseo alveolar na DPE induzida por corpo estranho em ratas

A. Estudo do Índice de Perda Óssea (IPO)

A indução da DPE nos animais que receberam apenas solução fisiológica a 0,9% (salina) resultou em reabsorção óssea significativa em relação aos animais sem DPE, cujo IPO foi próximo de zero. Observou-se que o AD administrado a partir do 5º dia da indução da DPE e diariamente até o 11º dia (tratamento curativo) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o IPO, representado pela redução na reabsorção óssea na face vestibular das maxilas em 74,71% em relação ao grupo de animais que receberam salina. Este efeito é comparável ao do tratamento preventivo com AD administrado 30 minutos antes da cirurgia e diariamente (83,9%), ao da DX na dose de 5 e 10 mg/kg (60,51% e 78,95%, respectivamente) e ao da associação entre as duas drogas (85,20%)(Figura 1).

B. Aspecto macroscópico da doença periodontal experimental (DPE) induzida por corpo estranho

Observou-se a partir da avaliação macroscópica da hemiarcada superior esquerda do grupo de animais submetidos a DPE e que recebeu salina (Figura 2B), que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a doença periodontal

experimentalmente, de forma a reproduzir os principais sinais clínicos da doença periodontal em humanos, tais como: reabsorção óssea alveolar, exposição de raízes e perda de contato interdental, em comparação aos animais normais, sem DPE (Figura 2A). Foi observada redução da perda óssea tanto no grupo tratado com AD 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (Figura 2C) como no tratado a partir do 5º dia da indução da DPE (Figura 2D), em relação ao grupo de animais com DPE que receberam salina (Figura 2B). A diminuição do IPO promovida pelo AD também foi semelhante à observada nos animais após a administração de DX5 (Figura 3B), DX10(Figura 3C) e DX associada com AD (Figura 3D).

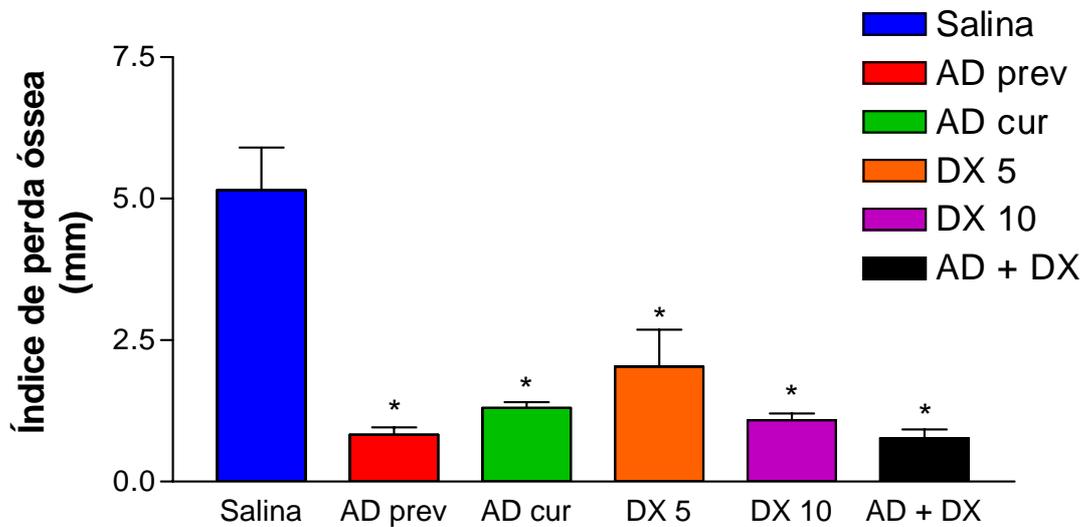


Figura 1: Efeito do Alendronato Dissódico (AD) e da Doxíciclina (DX) sobre o Índice de Perda Óssea (IPO) na doença periodontal experimental (DPE) induzida por corpo estranho em ratas. AD (0,25mg/kg, s.c.) foi administrado 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (preventivo). AD (0,25mg/kg, s.c.), DX (5 ou 10 mg/kg) ou salina (0,2ml) foram injetados a partir do 5º dia da indução da DPE (curativo). A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. Os animais foram sacrificados 11 dias após o procedimento cirúrgico. Observou-se que o AD reduziu de forma significativa a reabsorção na face vestibular das maxilas, tanto no tratamento curativo como no preventivo de forma comparável à doxíciclina em ambas as doses e à associação. As barras representam média \pm EPM de, no mínimo, cinco animais com DPE. *($p < 0,001$) indica diferença estatística em relação aos animais com DPE que receberam apenas salina (ANOVA, Bonferroni)

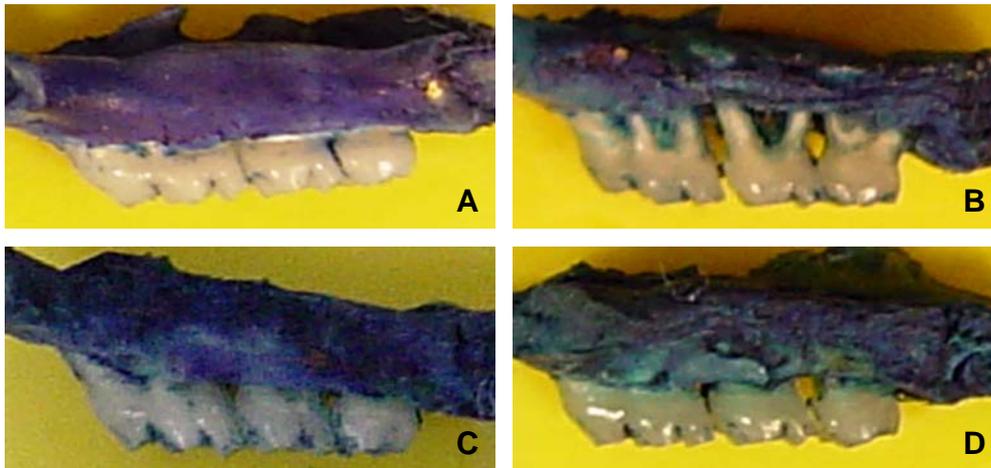


Figura 2: Aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com salina ou Alendronato Dissódico (AD). Os animais foram submetidos à indução da DPE por corpo estranho e receberam salina (0,2 ml;s.c.) ou alendronato (0,25 mg/kg; s.c.) 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (preventivo) ou a partir do 5º dia da indução da DPE (curativo). Os animais foram sacrificados no 11º dia e suas maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10%. Em seguida, as hemiarcadas foram separadas, dissecadas, coradas em azul de metileno a 1% e acomodadas em massa de modelar para posterior observação em microscópio com ocular graduada. **A:** Maxila de animal normal que não foi submetido a DPE. **B:** Maxila de animal com DPE, no qual foi administrada salina, mostrando intensa destruição óssea alveolar, exposição das raízes e perda do contato interdentário. **C:** Maxila de animal que foi submetido a DPE e recebeu AD como tratamento preventivo apresentando redução acentuada da reabsorção do osso alveolar. **D:** Maxila de animal com DPE que recebeu AD de forma curativa mostrando também uma diminuição da perda óssea alveolar.

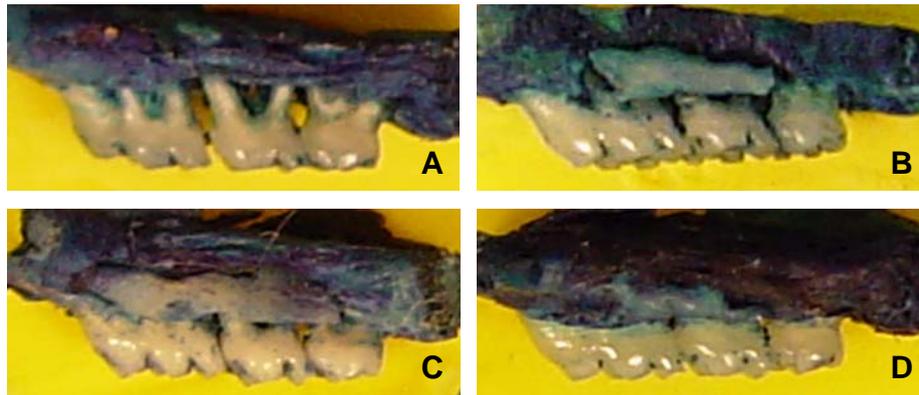


Figura 3: Aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com salina, Doxiciclina (DX) ou DX associado a Alendronato Dissódico (AD): Os animais foram submetidos à indução da DPE por corpo estranho e receberam salina (0,2 ml;s.c.), DX (5 ou 10 mg/kg; s.c.- DX5 ou DX10, respectivamente) ou AD(0,25 mg/kg) associado a DX5 diariamente, a partir do 5° dia após a cirurgia. Os animais foram sacrificados no 11° dia e suas maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10%. Em seguida, as hemiarcadas foram separadas, dissecadas, coradas em azul de metileno a 1% e acomodadas em massa de modelar para posterior observação em microscópio com ocular graduada. **A:** Maxila de animal com DPE, no qual foi administrado salina, mostrando intensa destruição óssea alveolar e exposição das raízes. **B:** Maxila de animal sujeito a DPE no qual foi aplicada DX 5 mg/kg, apresentando redução da reabsorção do osso alveolar. **C:** Maxila de animal com DPE e que recebeu DX 10mg/kg, revelando resultado semelhante ao anterior. **D:** Maxila de animal com DPE que recebeu AD e DX 5, indicando que também houve uma diminuição da reabsorção óssea alveolar, porém sem efeito sinérgico entre os medicamentos.

2. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) e da Doxíciclina (DX) sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratas

A análise histopatológica realizada no 11º dia das maxilas das ratas submetidas a DPE que receberam salina (Figura 4B), mostrando presença de infiltrado celular inflamatório acentuado, reabsorção completa do processo alveolar e destruição do cimento em relação ao grupo de animais normais, sem a doença (Figura 4A). Nos animais tratados com AD (0,25 mg/kg) 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (Figura 4C) observou-se preservação do processo alveolar e do cimento, com discreto infiltrado inflamatório. No grupo de animais tratados com AD a partir do 5º dia após a cirurgia, constatou-se ainda presença de discreto infiltrado celular inflamatório e preservação do processo alveolar e cimento (Figura 4D).

Nos animais nos quais foram administrados DX5, pôde-se observar manutenção parcial da integridade do processo alveolar e cimento, com presença de infiltrado celular inflamatório (Figura 5C). Em animais que receberam DX10, verificou-se processo alveolar e cimento preservados e ainda com discreto infiltrado inflamatório celular (Figura 5D). Os animais que foram tratados com a associação das duas drogas (AD + DX5) apresentaram preservação do processo alveolar e cimento radicular e ausência de infiltrado inflamatório (Figura 5E). Aumento de 40x.

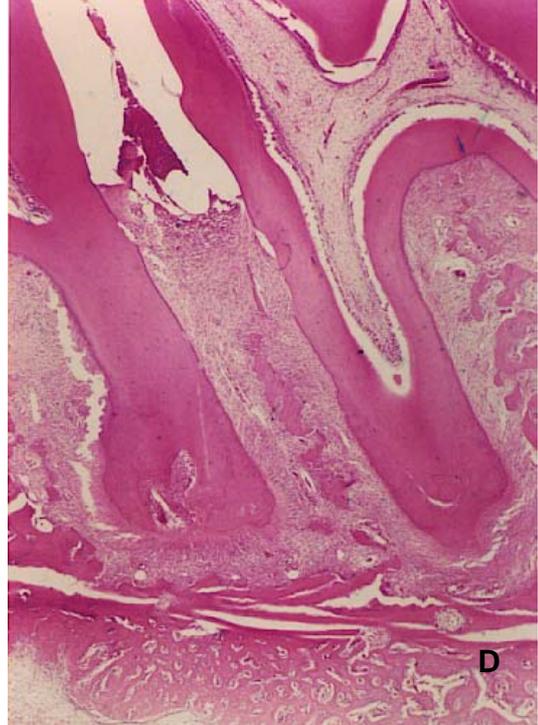
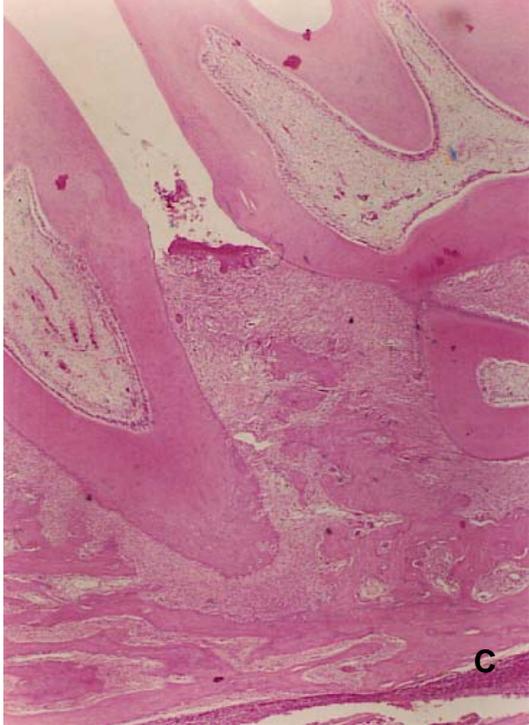
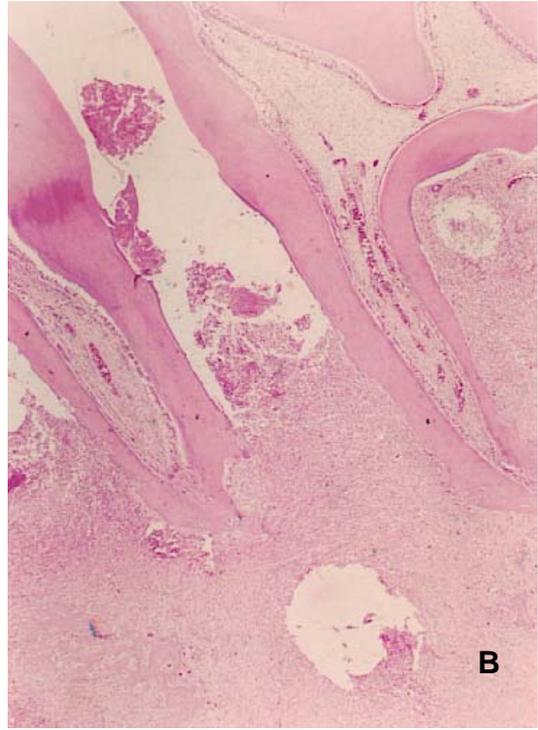


Figura 4: Fotomicrografias de periodontos de animais submetidos a DPE, que receberam salina ou Alendronato Dissódico (AD) e de animal normal sem DPE na coloração hematoxilina-eosina (HE). Os animais foram submetidos à indução da DPE através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno de seus segundos molares superiores esquerdos. As ratas receberam AD (0,25 mg/kg, s.c.) ou salina (0,2 ml, i.p.) 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (preventivo) ou a partir do 5º dia da indução da DPE (curativo). No 11º dia, foi feito o sacrifício dos animais com remoção das hemiarcadas, as quais foram processadas para coloração pelo método HE. **A.** Periodonto de animal normal sem DPE. **B.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu salina. **C.** Periodonto de animal normal com DPE ao qual foi administrado AD de forma preventiva, mostrando preservação do processo alveolar e do cemento e discreto infiltrado inflamatório. **D.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu AD de modo curativo, onde observou-se preservação parcial do processo alveolar, com presença de discreto infiltrado inflamatório e destruição parcial do cemento. **G:** gengiva; **LP:** ligamento periodontal; **PA:** processo alveolar; **C:** cemento. Aumento de 40x.

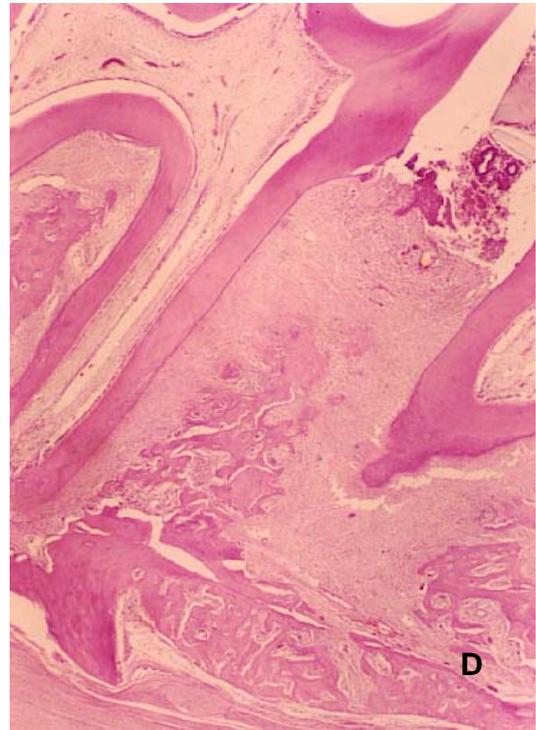
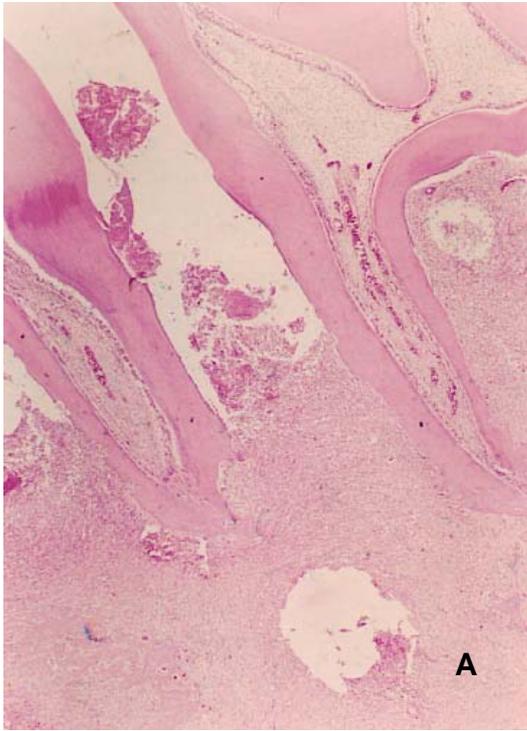


Figura 5: Fotomicrografias de periodontos de animais normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com salina, Doxiciclina (DX) ou Alendronato Dissódico (AD) associado à DX em coloração Hematoxilina-Eosina (HE): Os animais foram submetidos à indução da DPE por corpo estranho e receberam salina (0,2 ml;s.c.), DX (5 ou 10 mg/kg; s.c.- DX5 ou DX10, respectivamente) ou AD (0,25 mg/kg; s.c) associado a DX5 diariamente, a partir do 5º dia após a cirurgia. Os animais foram sacrificados no 11º dia e suas maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método HE. **A.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu salina. **B.** Periodonto de animal normal com DPE ao qual foi administrado DX5, mostrando preservação parcial do processo alveolar e do cemento e presença de infiltrado inflamatório. **C.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu DX10, onde observou-se processo alveolar e cemento preservados, com presença de infiltrado celular inflamatório discreto. **D.** Periodonto de animal submetido à DPE que recebeu AD e DX 5, mostrando processo alveolar e cemento preservados e discreto infiltrado inflamatório. Aumento de 40x.

2.1. Tabela dos escores histopatológicos

A tabela 3 representa os escores atribuídos à análise histopatológica das maxilas referente à figura 4. Os animais receberam AD 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (preventivo) ou a partir do 5º dia da indução da DPE (curativo) e foram sacrificados no 11º dia. A partir dos cortes seriados das hemiarcadas, observou-se que o tratamento com AD, tanto de forma preventiva como curativa, reduziu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) as alterações histopatológicas vistas na DPE, quando comparada às observadas em animais que receberam apenas salina.

A tabela 4 representa os escores atribuídos à análise histopatológica das maxilas referente à figura 5. Os animais receberam salina, DX 5, DX 10, AD associado a DX a partir do 5º dia da indução da DPE e diariamente, sendo sacrificados no 11º dia. A partir dos cortes seriados das hemiarcadas, observou-se que os tratamentos com DX5, DX10 e AD associado à DX5 reduziram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) as alterações histopatológicas vistas na DPE, quando comparada às observadas em animais que receberam apenas salina.

Tabela 3: Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratas

	Tratamentos			
	Naive	Salina	Preventivo	Curativo
Escores	0 (0-0)	3 (2-3)	0 (0-1)*	1 (1-1)*

A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundos molares superiores esquerdos de ratas devidamente anestesiadas. Os animais receberam AD (0,25 mg/kg, s.c.) ou salina (0,2 ml, i.p.) 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (preventivo) ou a partir do 5º dia da indução da DPE (curativo). No 11º dia foi feito o sacrifício dos animais e remoção das hemiarcadas para confecção dos cortes seriados, processados para coloração pelo método HE. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 5 animais, onde as regiões entre os 1º e 2º molares foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de infiltrado celular e grau de preservação do processo alveolar e cimento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas salina (Kruskal-Wallis).

Tabela 4: Efeito da doxiciclina (DX) e da associação do Alendronato Dissódico (AD) com doxiciclina (DX) sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratas

	Tratamentos				
	Naive	Salina	DX5	DX10	AD+DX5
Escores	0 (0-0)	3 (2-3)	1 (1-1)*	1 (1-2)*	1 (0-2)*

A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundos molares superiores esquerdos de ratas devidamente anestesiadas. Os animais receberam salina (0,2 ml, i.p.), DX (5 ou 10 mg/kg; s.c.- DX5 ou DX10, respectivamente) ou AD (0,25 mg/kg) associado a DX5 diariamente, a partir do 5º dia após a cirurgia. No 11º dia foi feito o sacrifício dos animais e remoção das hemiarquadas para confecção dos cortes seriados, processados para coloração pelo método HE. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 5 animais, onde as regiões entre os 1º e 2º molares foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de infiltrado celular e grau de preservação do processo alveolar e cemento. *p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas salina (Kruskal-Wallis).

4. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) e da Doxiciclina (DX) sobre as alterações das fibras colágenas observadas na DPE em ratas

A análise das fibras colágenas realizada no 11º dia das maxilas das ratas com DPE que receberam apenas salina (Figura 6B), mostrou destruição e desorganização das fibras colágenas, em relação ao grupo de animais normais sem a doença, nos quais as fibras colágenas se encontram organizadas na gengiva e no ligamento periodontal na direção cimento-osso alveolar (Figura 6A). Nos animais tratados com AD 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (Figura 6C) observou-se preservação importante das fibras colágenas do ligamento periodontal e das fibras gengivais. No grupo de animais tratados com AD a partir do 5º dia após a cirurgia, constatou-se preservação parcial das fibras colágenas em comparação ao periodonto de animais com DPE que receberam salina (Figura 6D).

Na análise das fibras colágenas realizada no 11º dia das maxilas das ratas com DPE nas quais foram administrados DX (5 mg/kg), observou-se as fibras colágenas parcialmente preservadas (Figura 7C). Nos animais que receberam DX (10 mg/kg) verificou-se preservação parcial das fibras colágenas porém sem orientação definida (Figura 7D). Quando os animais receberam a associação das duas drogas (AD e DX 5), constatou-se fibras colágenas íntegras e bem orientadas (Figura 7E).

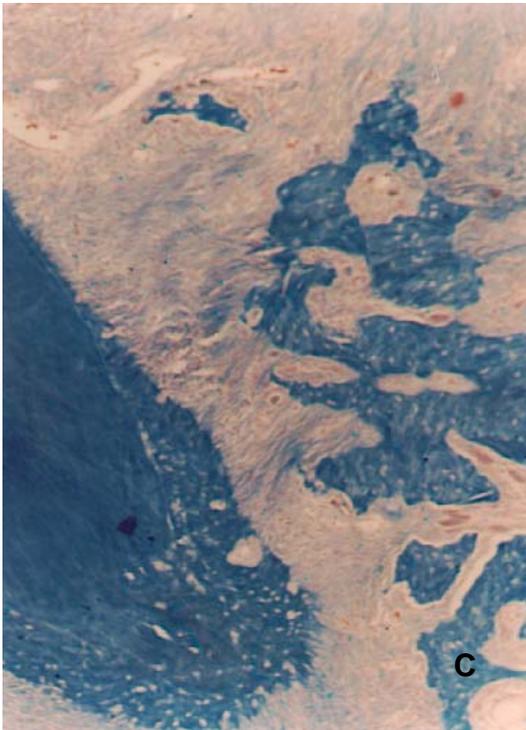
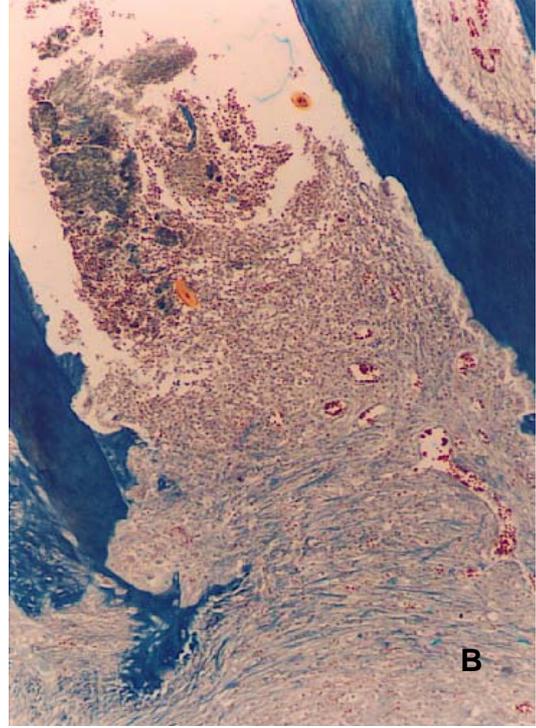
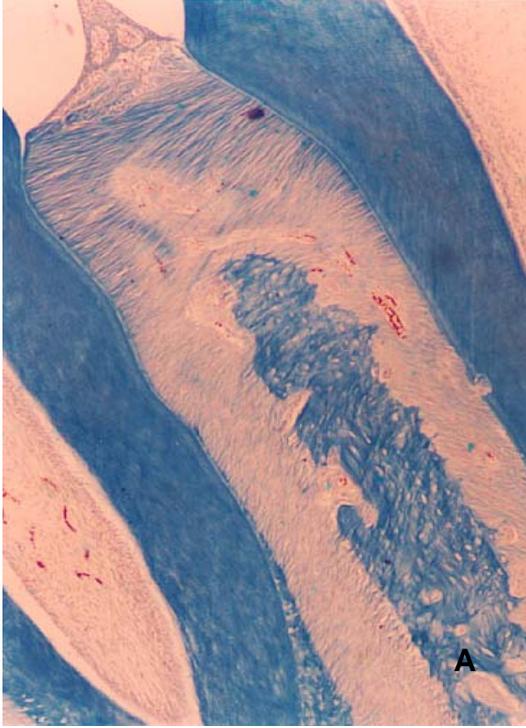


Figura 6: Fotomicrografias de periodontos de animais submetidos a DPE, que receberam salina ou Alendronato Dissódico (AD) e de animal normal sem DPE na coloração Tricrômio de Mallory. Os animais foram submetidos à indução da DPE através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundos molares superiores esquerdos. As ratas receberam AD (0,25 mg/kg, s.c.) ou salina (0,2 ml, i.p.) 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia (preventivo) ou a partir do 5º dia da indução da DPE (curativo). No 11º dia foi feito o sacrifício dos animais, com remoção das hemiarcadas, as quais foram processadas para coloração pelo método Tricrômio de Mallory. **A.** Periodonto de animal normal sem DPE. **B.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu salina. **C.** Periodonto de animal normal com DPE ao qual foi administrado AD de forma preventiva, mostrando preservação parcial das fibras colágenas do ligamento periodontal e destruição parcial das fibras gengivais. **D.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu AD de modo curativo, onde também foi observado as fibras colágenas parcialmente preservadas. Aumento de 100x.

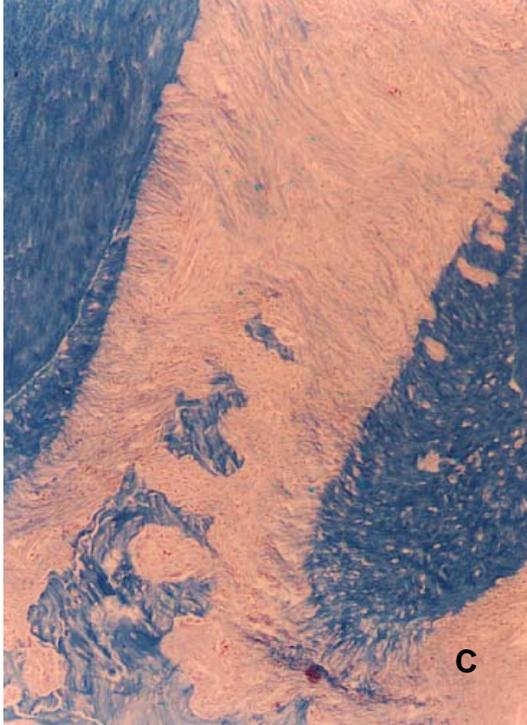
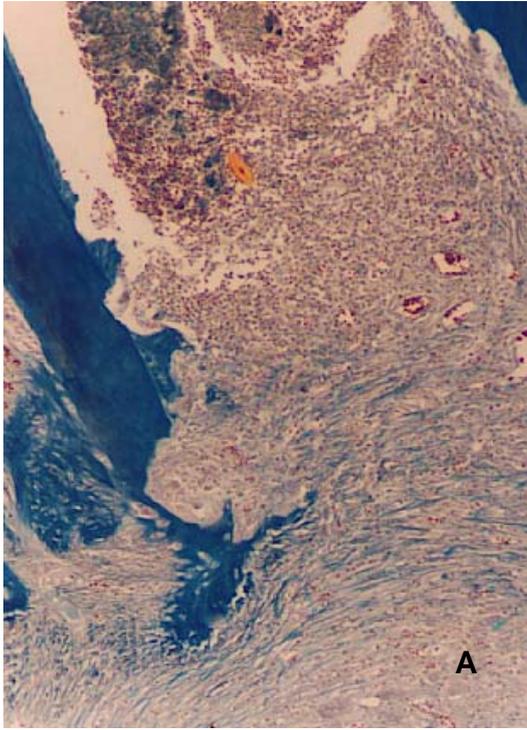


Figura 7: Fotomicrografias de periodontos de animais normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com salina, Alendronato Dissódico (AD), Doxiciclina (DX) ou AD associado à DX em coloração Tricrômio de Mallory: Os animais foram submetidos à indução da DPE por corpo estranho e receberam salina (0,2 ml;s.c.), AD (0,25 mg/kg; s.c), DX (5 ou 10 mg/kg; s.c.- DX5 ou DX10, respectivamente) ou AD associado a DX5 diariamente, a partir do 5º dia após a cirurgia. Os animais foram sacrificados no 11º dia e suas maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método HE. **A.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu salina. **B.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu DX5, onde observou-se as fibras colágenas do ligamento periodontal parcialmente preservadas. **C.** Periodonto de animal com DPE, no qual foi administrado DX10, onde observa-se preservação das fibras colágenas porém sem orientação definida. **D.** Periodonto de animal submetido à DPE que recebeu AD e DX 5, mostrando fibras colágenas íntegras e bem orientadas. Aumento de 40x.

5. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre as alterações da gengiva de ratas submetidas a DPE

Análise da gengiva vestibular de animais submetidos DPE durante 6 horas

O grupo de animais submetidos à DPE e que recebeu salina (Figura 8C e 8D) apresentou intenso infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares. Além disso, observou-se gengiva inflamada com hemorragia, edema e infiltração de polimorfonucleares no epitélio em relação ao grupo de animais normais sem a doença (Figura 8A e 8B). Nas ratas tratadas com AD 30 minutos antes da cirurgia observou-se redução acentuada do infiltrado inflamatório com ausência de polimorfonucleares (Figura 8E e 8F).

Análise da gengiva vestibular de animais submetidos DPE durante 11 dias

Observou-se nos animais submetidos a DPE e que receberam apenas salina a existência de infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares, além da presença de eosinófilos e polimorfonucleares (Figura 9B). As ratas, tanto as que receberam AD 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia como aquelas que receberam a partir do 5º dia, apresentaram uma redução do infiltrado inflamatório às custas de mononucleares e ausência de neutrófilos (Figura 9C e 9D, respectivamente).

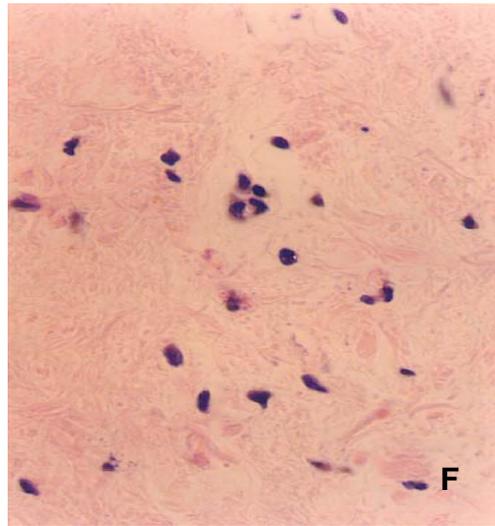
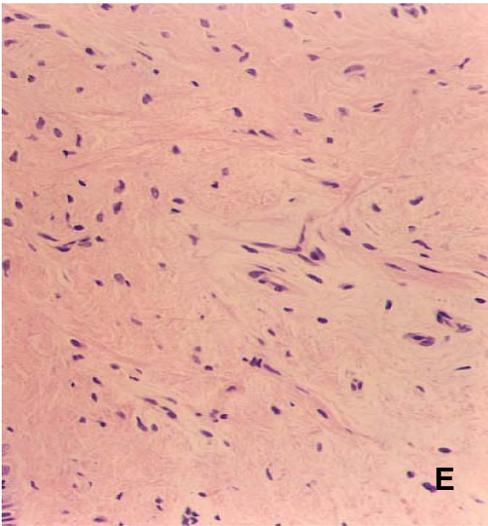
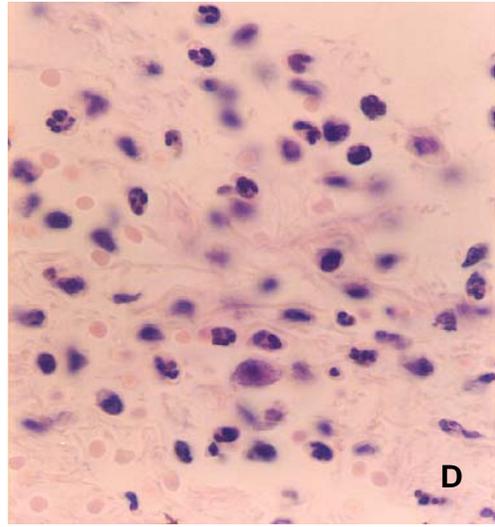
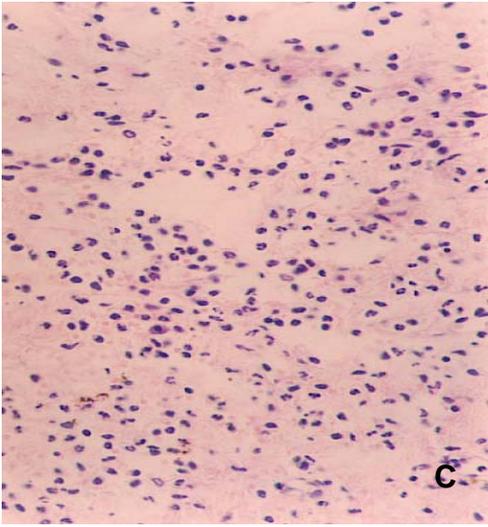
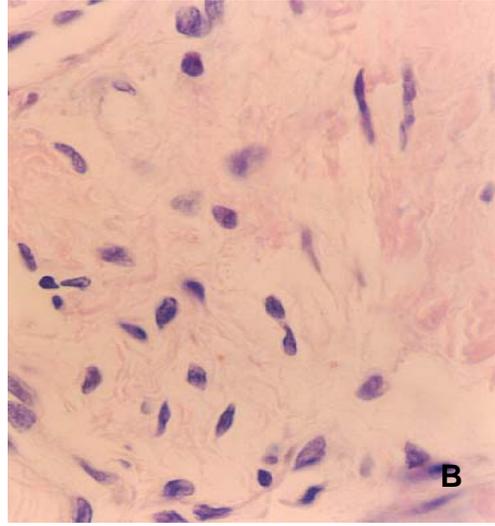
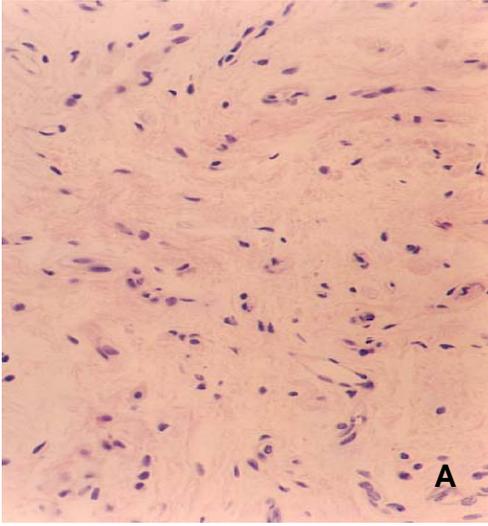


Figura 8: Fotomicrografias da gengiva vestibular de animal sem DPE e de animais submetidos à DPE e que receberam salina ou Alendronato Dissódico (AD): Os ratos foram submetidos à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina (0,2 ml) ou AD (0,25 mg/ml; s.c.) trinta minutos antes da cirurgia (preventivo). Os animais foram sacrificados na 6ª hora, suas hemiarcadas foram dissecadas a fim de remover a gengiva na região do segundo molar superior esquerdo, sendo estas processadas para coloração pelo método HE. **A e B:** Gengiva de animal normal sem DPE. **C e D:** Gengiva de animal com DPE que recebeu salina, mostrando edema, além de um intenso infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares. **E e F:** Gengiva de animal que foi submetido a DPE e com administração de AD, apresentando-se uma redução acentuada do infiltrado neutrofílico. Aumento de 400x à esquerda e 1000x à direita.

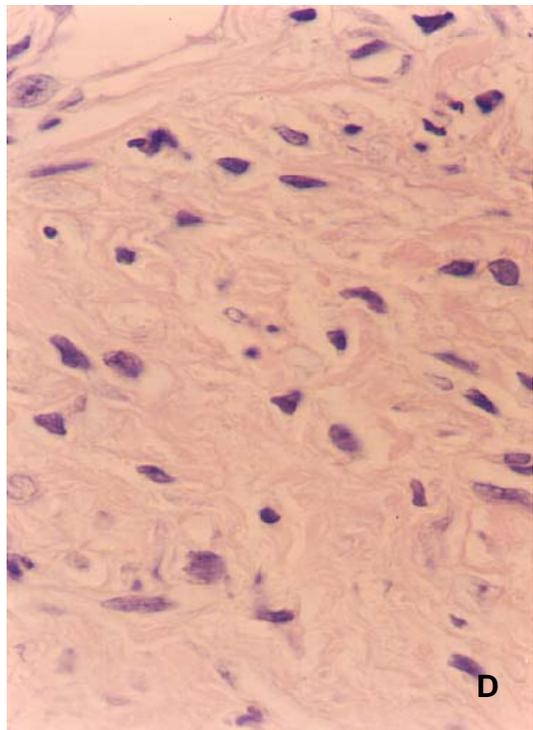
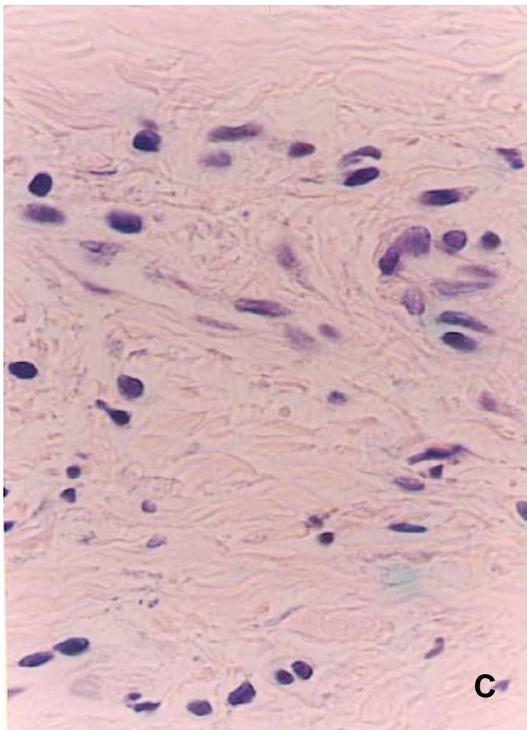
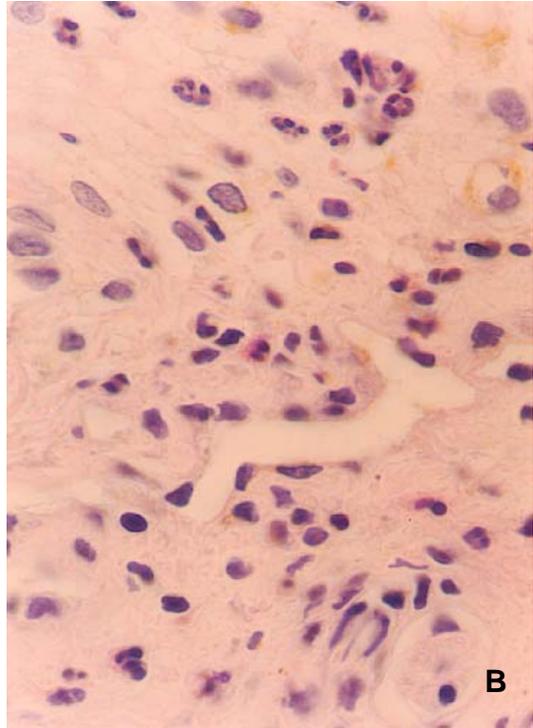
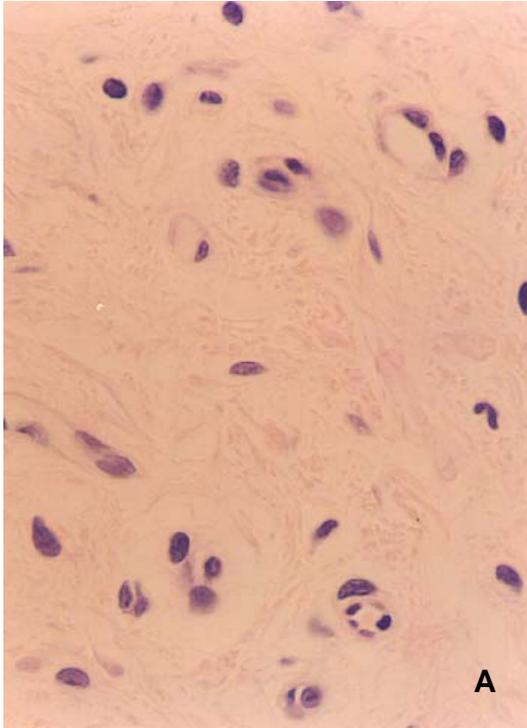


Figura 9: Fotomicrografias da gengiva vestibular de animal normal e de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) durante 11 dias e que receberam salina ou Alendronato Dissódico (AD). Os ratos foram submetidos à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina (0,2 ml) ou AD (0,25 mg/ml; s.c.) trinta minutos antes da cirurgia e diariamente (preventivo) ou a partir do 5º dia após a cirurgia (curativo). Os animais foram sacrificados no 11º dia, suas hemiarquadas foram dissecadas a fim de remover a gengiva na região dos molares superiores esquerdos, sendo estas processadas para coloração pelo método HE. **A:** Gengiva de animal normal sem DPE. **B:** Gengiva de animal que foi submetido à DPE e que recebeu salina, mostrando presença de intenso infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares e presença de polimorfonucleares, eosinófilos e mastócitos. **C:** Gengiva de animal com DPE que recebeu AD de forma preventiva, mostrando redução do infiltrado inflamatório às custas de mononucleares e ausência de neutrófilos. **D:** Gengiva de animal submetido à DPE, no qual foi administrado AD de modo curativo, discreto infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares, presença de eosinófilos e ausência de neutrófilos (Aumento 1000x).

6. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a marcação de TNF pelo método de imunohistoquímica

Análise da gengiva vestibular de animais submetidos DPE durante 6 horas

As ratas, pertencentes ao grupo com DPE e que recebeu apenas salina, apresentaram infiltrado celular inflamatório com presença de mastócitos e grande quantidade de polimorfonucleares marcados e alguns mononucleares discretamente marcados (Figura 10C) em relação ao grupo normal sem doença, onde há leve marcação dentro dos mastócitos (Figura 10B). No grupo que recebeu tratamento com AD 30 minutos antes da cirurgia, foi observado uma redução do infiltrado inflamatório e da marcação para TNF por imunohistoquímica (Figura 10D).

Análise da gengiva vestibular de animais submetidos DPE durante 11 dias

Após 11 dias, no grupo de animais submetidos a DPE e que recebeu salina constatou-se a existência de intenso infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares e presença de mononucleares marcados (Figura 11B), além da ocorrência de marcação no epitélio, endotélio e músculos em relação ao grupo sem DPE (dado não mostrado). Os animais que receberam tratamento com AD,

tanto de modo preventivo como curativo, apresentaram um discreto infiltrado celular inflamatório com redução da marcação dos mononucleares (Figura 11C e 11D, respectivamente).

7. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a produção de interleucina-1 (IL-1)

As ratas que foram submetidas à DPE e que recebeu apenas salina, apresentaram intensa produção de IL-1 em relação ao grupo normal sem doença., No grupo que recebeu tratamento com AD 30 minutos antes da cirurgia, também foi observado um aumento significativo na produção desta citocina quando comparado ao grupo naive. Não houve diferença entre os grupos submetidos à DPE e que receberam salina ou AD (Figura 12).

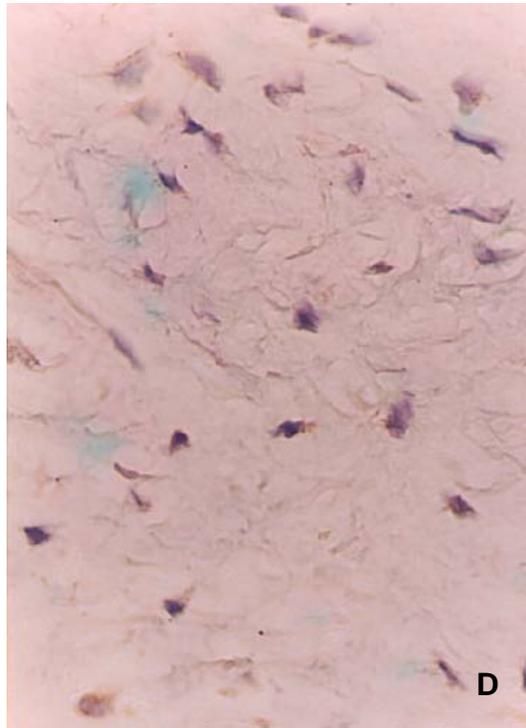
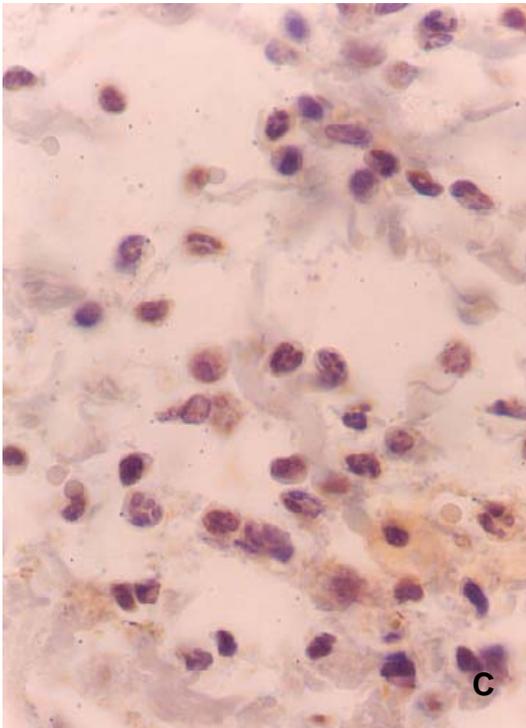
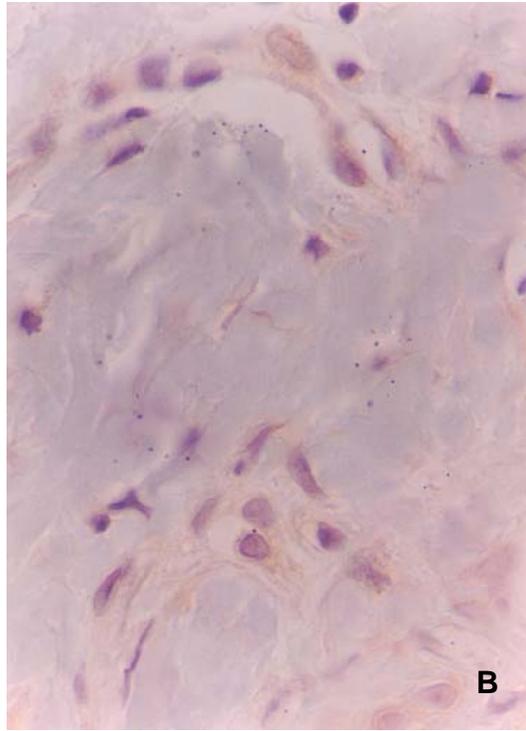
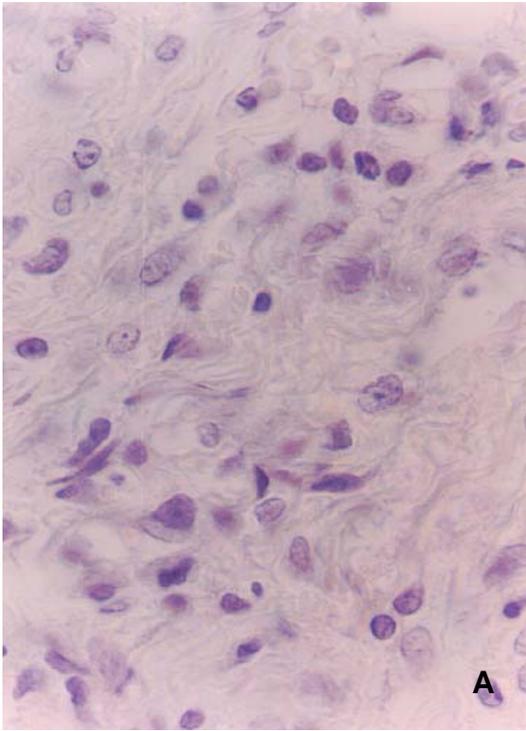


Figura 10: Imunohistoquímica da gengiva de animais sem DPE e de animais submetidos à DPE e que receberam salina ou alendronato: As ratas foram submetidas à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina (0,2ml) ou alendronato (0,25 mg/ml;s.c.) trinta minutos antes da cirurgia. Os animais foram sacrificados na 6ª hora, suas hemiarcadas foram dissecadas a fim de remover a gengiva na região do segundo molar superior esquerdo, sendo processadas por imunohistoquímica. **A.** Gengiva de animal com DPE não incubadas com o anticorpo marcador para TNF. **B.** Gengiva de animal normal sem DPE, com marcação para TNF apenas dentro dos mastócitos. **C.** Gengiva de animal que foi submetido a DPE e recebeu salina, mostrando grande quantidade de polimorfonucleares intensamente marcados, com presença de mastócitos e mononucleares também marcados. **D.** Gengiva de animal com DPE no qual foi administrado AD observando-se uma diminuição da marcação de TNF por imunohistoquímica. Aumento 1000x.

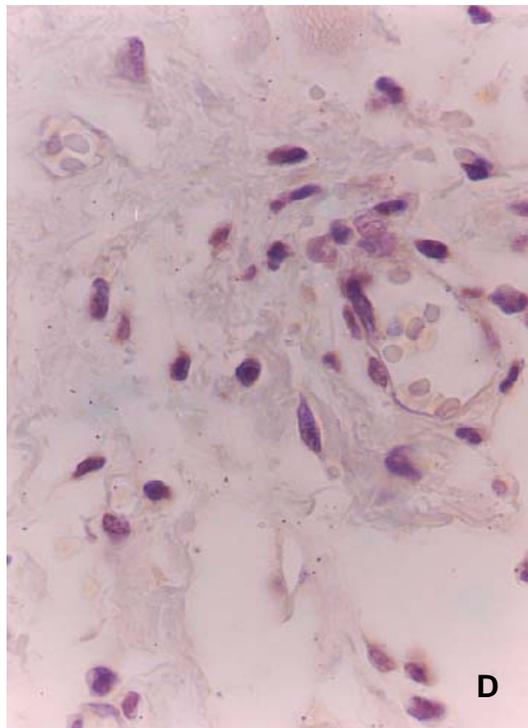
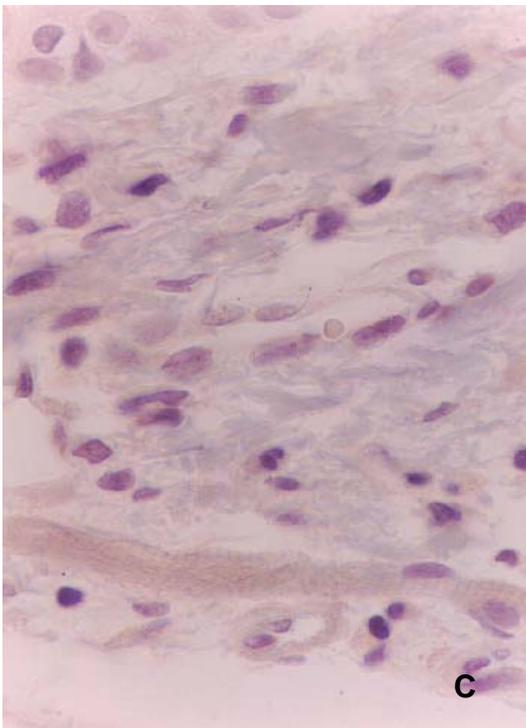
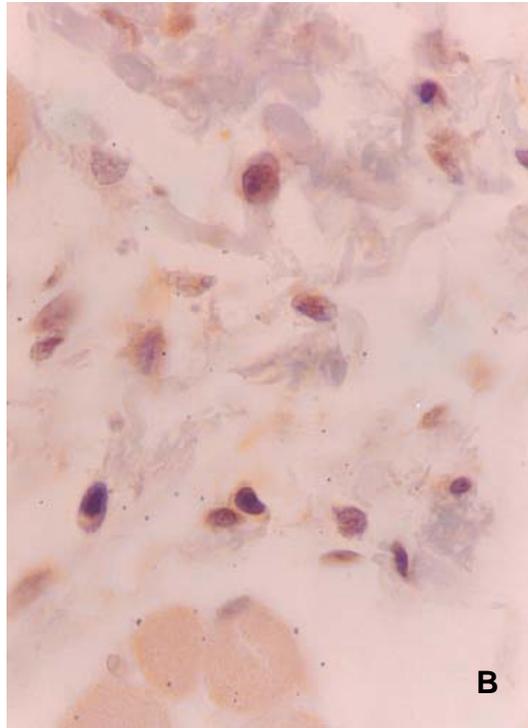
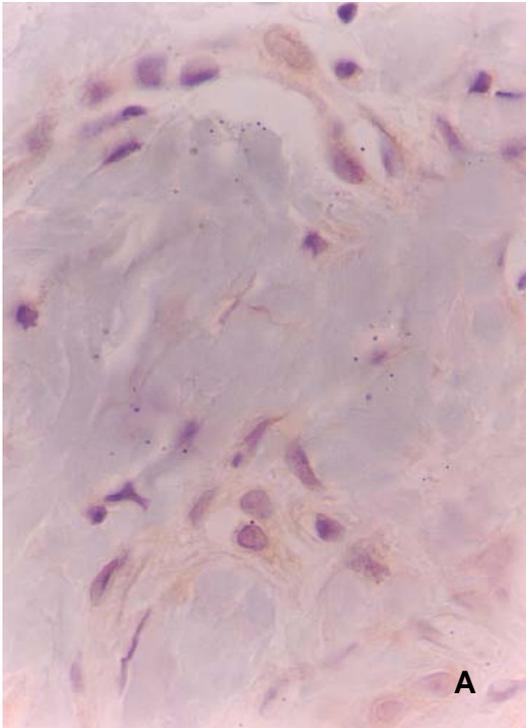


Figura 11: Imunohistoquímica da gengiva de animais sem DPE e de animais submetidos à DPE durante 11 dias e que receberam salina ou alendronato.

As ratas foram submetidas à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina (0,2ml) ou alendronato (0,25 mg/ml;s.c.) todos os dias a partir do 5º dia após a cirurgia ou desde trinta minutos antes da mesma. Os animais foram sacrificados no 11º dia, suas hemiarcadas foram dissecadas a fim de remover a gengiva na região do segundo molar superior esquerdo, sendo estas processadas por imunohistoquímica. **A.** Gengiva de animal normal sem DPE, mostrando ausência quase total de marcação para TNF. **B.** Gengiva de animal que foi submetido a DPE e que recebeu salina, mostrando presença de mononucleares marcados. **C.** Gengiva de animal com DPE no qual foram administrado AD desde o 5º dia após a cirurgia, apresentando mononucleares discretamente marcados. **D.** Gengiva de animal submetido a DPE e que recebeu AD desde 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia, também mostrando uma diminuição da marcação para TNF. Aumento 100x.

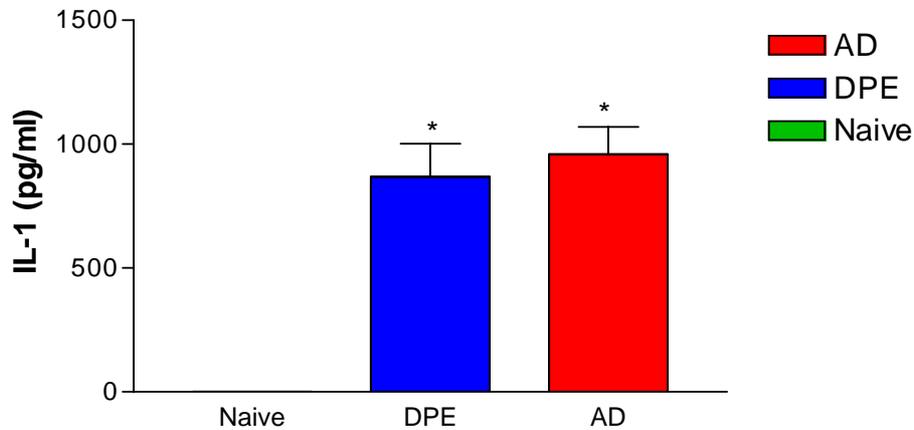


Figura 12: Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a produção de interleucina-1 β (IL-1 β) em gengivas de ratas normais (naive) ou submetidas à doença periodontal experimental (DPE). As ratas foram submetidas à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina (0,2ml) ou alendronato (0,25 mg/ml; s.c.) trinta minutos antes da cirurgia. Os animais foram sacrificados na 6^a hora, suas hemiarcadas foram dissecadas a fim de remover a gengiva na região dos molares superiores esquerdos, sendo processadas para análise de IL-1 β por ELISA. Observou-se um aumento na produção de IL-1 β nos animais tratados com AD ou salina em relação ao grupo naive (* $p < 0,001$).

8. Efeito do Alendronato Dissódico sobre o leucograma das ratas submetidas a DPE

AD administrado de forma preventiva foi capaz de reduzir de forma significativa a leucocitose e a neutrofilia na 6ª hora, assim como a leucocitose, o número de mononucleares e de neutrófilos no 11º dia. Quando administrado de modo curativo, AD promoveu a diminuição do número de leucócitos totais, de neutrófilos e de mononucleares no 11º dia (Figura 13).

9. Efeito da Doença Periodontal Experimental (DPE) sobre a dosagem de mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas

Em animais submetidos a DPE, constatou-se um aumento significativo da MPO na gengiva 6 horas após a cirurgia ($p < 0,01$) tanto em relação a animais sem a doença como em relação a animais com 11 dias de DPE (Figura 14).

10. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a dosagem de mieloperoxidase em ratas após 6 horas da indução da DPE

No grupo de animais submetidos à DPE e tratados com AD, ocorreu uma diminuição significativa da absorvância na dosagem de MPO na gengiva destes animais em relação aos animais com DPE e que receberam salina, observada pelos valores da área sob a curva (ASC) ($p < 0,001$). Houve também diferença

estatística, entre o grupo de animais normais e os grupos com DPE e que receberam tratamento com AD ou salina ($p < 0,001$; Figura 15).

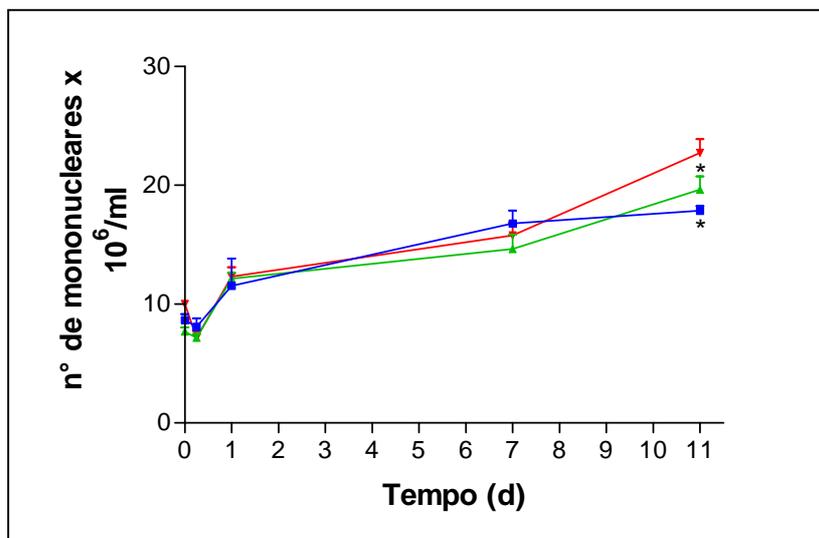
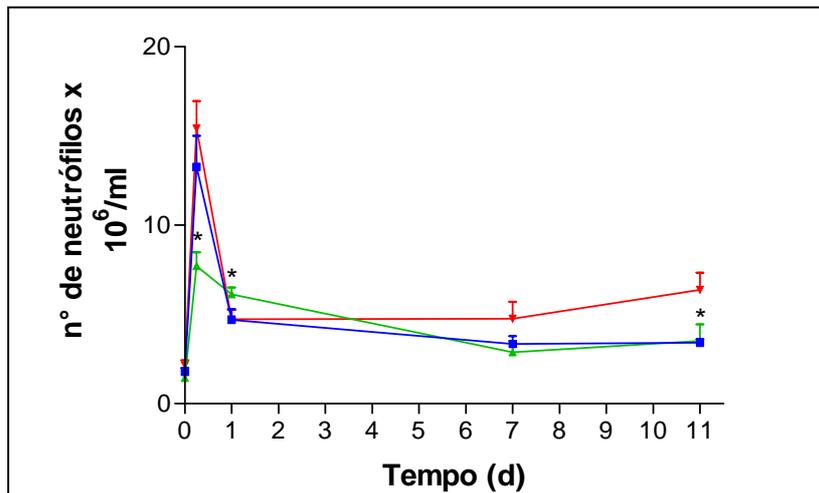
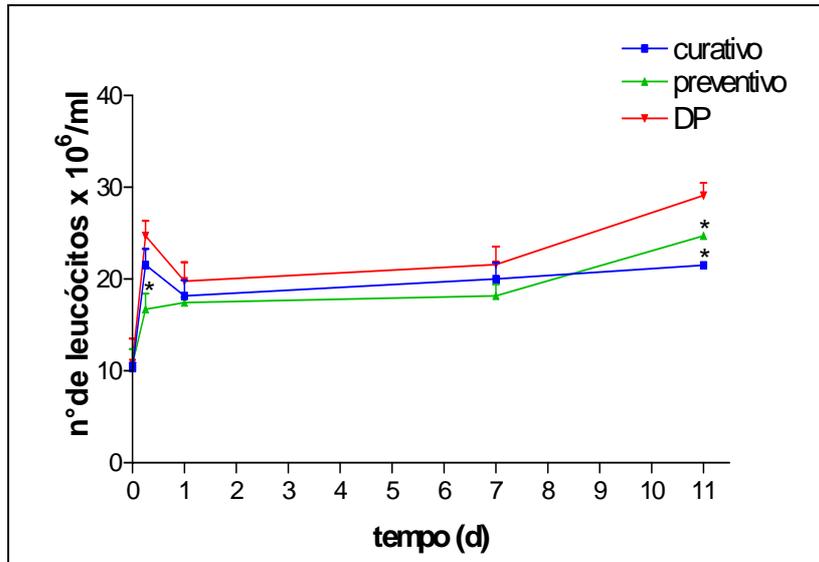


Figura 13: Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre o leucograma das ratas submetidas a doença periodontal experimental (DPE). AD (0,25 mg/kg, s.c.) administrado 30 minutos antes da indução da DPE e durante os 11 dias subseqüentes (preventivo), reduziu significativamente a leucocitose e a neutrofilia na 6ª hora, além de diminuir também o número de leucócitos e de mononucleares no 11º dia. Quando administrado a partir do 5º dia após a indução da DPE (curativo), AD promoveu diminuição significativa na leucocitose, no número de neutrófilos e no aumento de mononucleares no 11º dia. Os pontos representam média \pm EPM do número de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C) $\times 10^6$ /ml. * $p < 0,05$ indica diferença estatística do grupo tratado com AD em relação ao grupo submetido à DPE e tratado com salina. O número de animais utilizados para cada tratamento foi, no mínimo, cinco (ANOVA, Bonferroni).

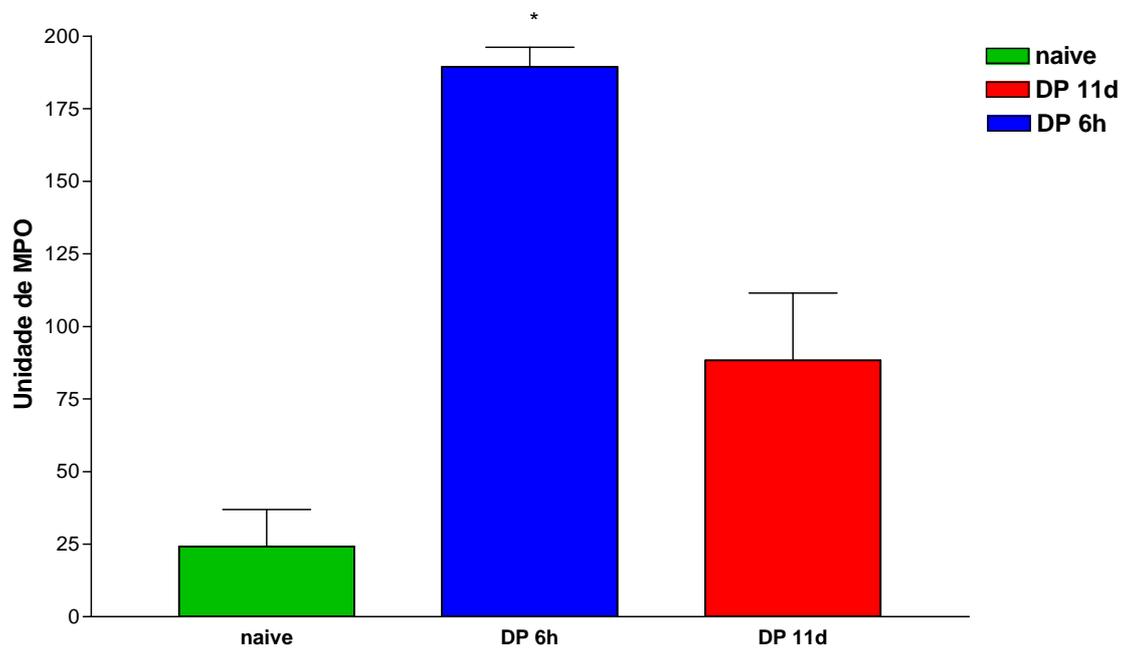


Figura14: Dosagem de mieloperoxidase (MPO) nas gengivas de ratas normais (naive) ou ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE). Os animais foram submetidos à indução da DPE através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. As ratas foram sacrificadas na 6ª hora e no 11º dia. A medida da MPO foi realizada por observação em espectrofotômetro após 1 minuto do início da reação colorimétrica pelo método de Kaplow. Observou-se um aumento significativo de MPO na gengiva na 6ª hora após a indução da DPE. As barras representam média ± EPM. * $p < 0,01$ representa diferença estatística significativa em relação ao grupo naive e ao grupo com DPE e sacrificado após 11 dias da cirurgia (ANOVA, Bonferroni).

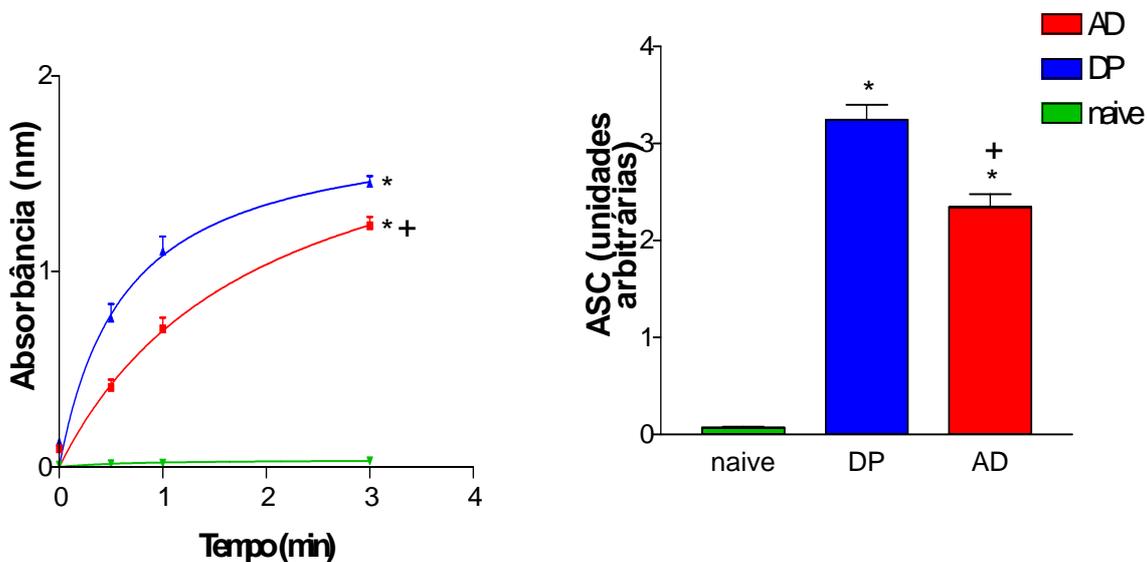


Figura 15: Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a dosagem de MPO em ratos submetidas a doença periodontal experimental (DPE). Os animais foram submetidos à indução da DPE através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. As ratas receberam salina (0,2 ml) ou AD (0,25 mg/ml; s.c.) trinta minutos antes da cirurgia, sendo sacrificadas 6 horas após a cirurgia. A medida da MPO foi realizada por observação em espectrofotômetro após 1 minuto do início da reação colorimétrica pelo método de Kaplow. As curvas representam a variação de absorbância de acordo com o tempo. As barras representam média \pm EPM para os valores da área sob a curva (ASC) em unidades arbitrárias. * $p < 0,001$ em relação ao grupo naive. + $p < 0,001$ em relação ao grupo com DPE e que recebeu apenas salina.

11. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a migração de leucócitos em modelo de peritonite

Efeito do AD sobre a migração do número de leucócitos totais em modelo de peritonite

O pré-tratamento com AD diminuiu significativamente a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal após 4 horas do estímulo inflamatório (Carragenina) em comparação com os animais pré-tratados com salina ($p < 0,001$; Figura 16).

Efeito do AD sobre a migração de neutrófilos em modelo de peritonite

O pré-tratamento com AD diminuiu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após 4 horas do estímulo inflamatório (Carragenina) em comparação com os animais pré-tratados com salina ($p < 0,001$; Figura 17).

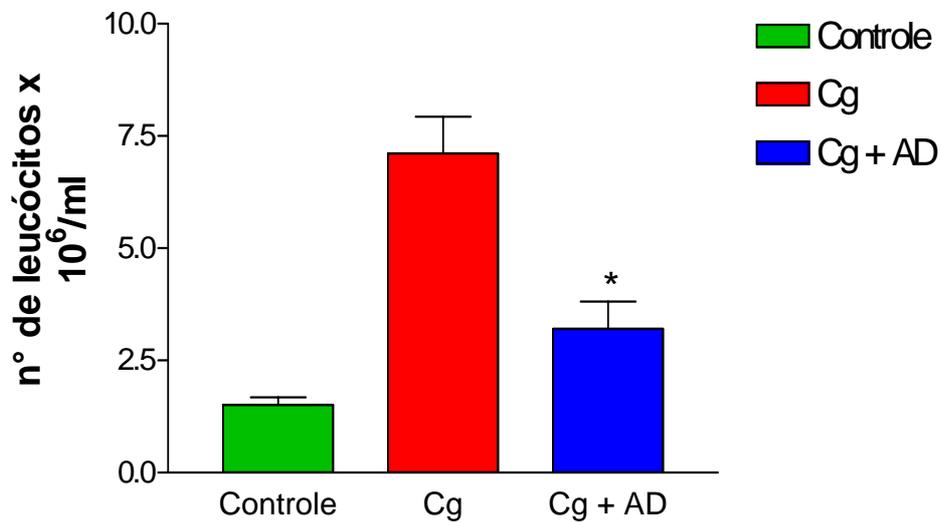


Figura 16: Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a migração de leucócitos em modelo de peritonite. AD (0,25 mg/kg, s.c.) ou salina (0,2 ml) foram administrados 1 hora antes da indução da peritonite com Carragenina (300 μ g/ml). Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo inflamatório. Observou-se diminuição significativa do número de leucócitos na cavidade peritoneal no grupo que recebeu Cg + AD (* $p < 0,001$) em relação ao grupo que recebeu Cg e tratado com salina. As barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo (Anova, Bonferroni).

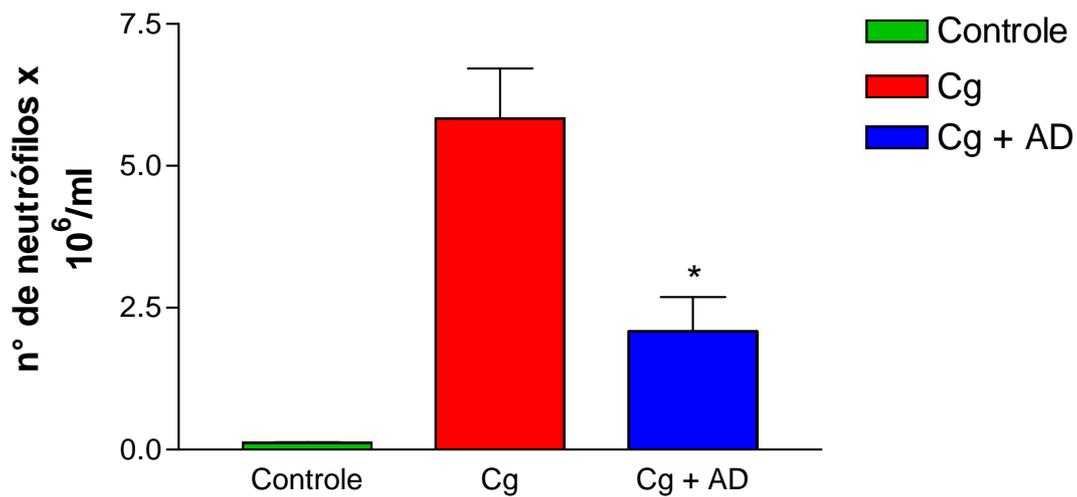


Figura 17: Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a migração de neutrófilos em modelo de peritonite. A peritonite foi induzida através da administração de Carragenina (300 μ g/ml, i.p.). Foram administrados AD (0,25 mg/kg, s.c.) ou salina (0,2 ml) 1 hora antes da indução e os animais sacrificados 4 horas após a indução da inflamação. Mostrou-se que o AD inibiu de forma significativa a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (* $p < 0,001$). As barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo (ANOVA, Bonferroni).

12. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre as alterações microbiológicas em ratas submetidas a DPE

Observou-se o crescimento de *Fusobacterium nucleatum* e bacilos Gram-negativos pigmentados em todos os animais submetidos a DPE e tratados com salina. O AD inibiu o crescimento de bactérias próprias da doença periodontal, como por exemplo, *Fusobacterium nucleatum* e bacilos Gram-negativos pigmentados, sendo a flora bacteriana nestes animais semelhante àquela encontrada em animais normais sem DPE. Contudo, foi observado em apenas 2 animais (23%) o crescimento de *Fusobacterium nucleatum* mostrando, ainda assim, um efeito inibitório significativo do AD em relação ao grupo que recebeu apenas salina. (Tabela 5).

Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre o crescimento de *Peptostreptococcus* sp. isolado de um animal submetido a DPE

O AD inibiu o crescimento de *Peptostreptococcus* sp. em meio de cultura líquido (BHI), sendo observada turvação de acordo com a escala McFarland nº 2, quando comparado com o meio de cultura sem AD, onde a turvação de acordo com a mesma escala foi nº 10 (Figura 18). O efeito inibitório do AD também foi observado na bacterioscopia pelo método de Gram (Figura 19) e em cultura em ágar-sangue (Figura 20).

Tabela 5: Estudo microbiológico comparativo entre animais normais, com DPE e tratados com Alendronato Dissódico.

Ratos	Microbiota	% de animais
Naive	Isolamento de <i>Peptostreptococcus</i> sp, <i>Streptococcus</i> sp e diplococos Gram-negativos. Presença também de bacilos Gram-negativos facultativos.	100%
DPE	Isolamento de <i>Fusobacterium nucleatum</i> , bacilos Gram-negativos pigmentados, <i>Peptostreptococcus</i> sp, bacilos Gram-negativos e facultativos e <i>Proteus</i> sp.	100%
DPE+ AD	Isolamento de <i>Peptostreptococcus</i> sp, cocobacilo Gram-negativo anaeróbio, <i>Streptococcus</i> sp, bacilo Gram-negativo facultativo. Nenhuma cultura do material de gengiva dos animais apresentou bacilos Gram-negativos pigmentados e em apenas 23 % dos animais, foi isolado <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	77%

Observou-se que o AD foi capaz de inibir o crescimento de bactérias características da doença periodontal, tais como bacilos Gram-negativos pigmentados e *Fusobacterium nucleatum*, sendo a flora bacteriana encontrada nestes animais semelhante àquela dos animais normais. Porém, houve crescimento de *Fusobacterium nucleatum* em apenas 2 dos 9 animais no grupo tratado com AD. Em ratas com DPE e tratadas com salina, foi observado o

crescimento de *Fusobacterium nucleatum* e bacilos Gram-negativos pigmentados em todos os animais. A coluna 3 representa a porcentagem dos animais que possuem a flora bacteriana representada na coluna 2.

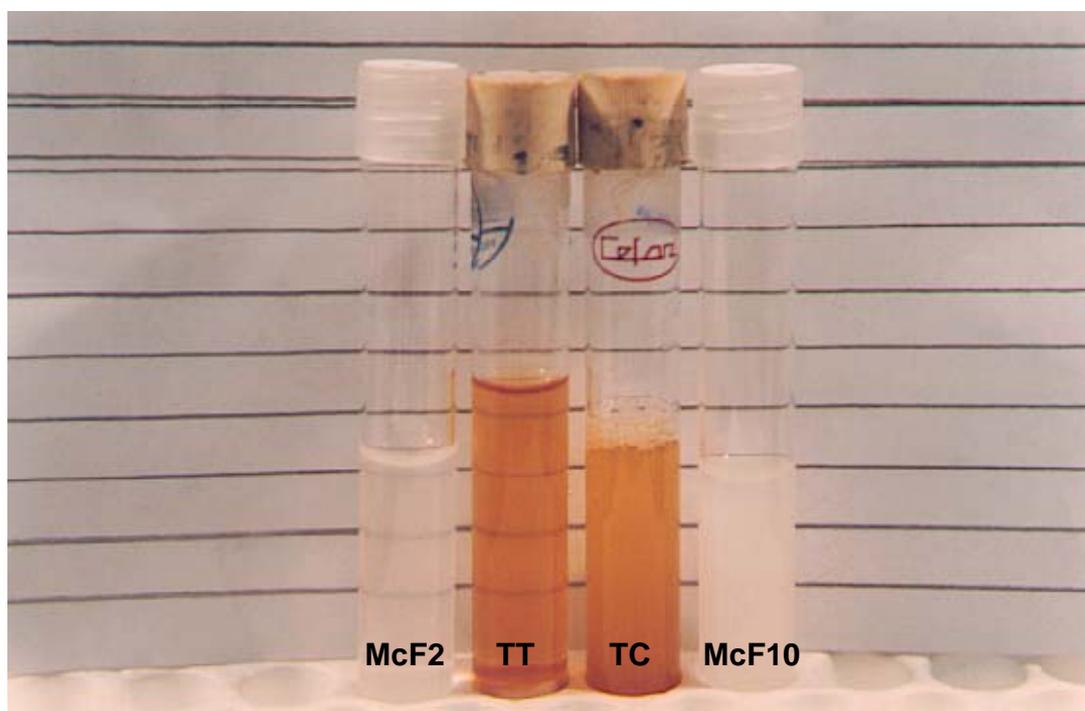


Figura 18: Efeito do AD sobre o crescimento de *Peptostreptococcus* sp. isolado de um animal submetido a DPE em meio de cultura líquido. *Peptostreptococcus* sp foi isolado de uma rata após 11 dias de DPE e o mesmo foi inoculado em tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido (BHI). A leitura da turvação é realizada a olho nu comparando-se a turvação dos tubos de ensaio com o tubo da escala McFarland. Na figura, pode ser observado o crescimento de *Peptostreptococcus* sp no tubo controle (TC) equivalente a McFarland n° 10 (McF 10). No tubo teste (TT), o qual continha 28 mg/ml de AD, o crescimento desta bactéria equivaleu a McFarland n° 2 (McF 2), mostrando que o AD inibiu o crescimento de *Peptostreptococcus* sp.

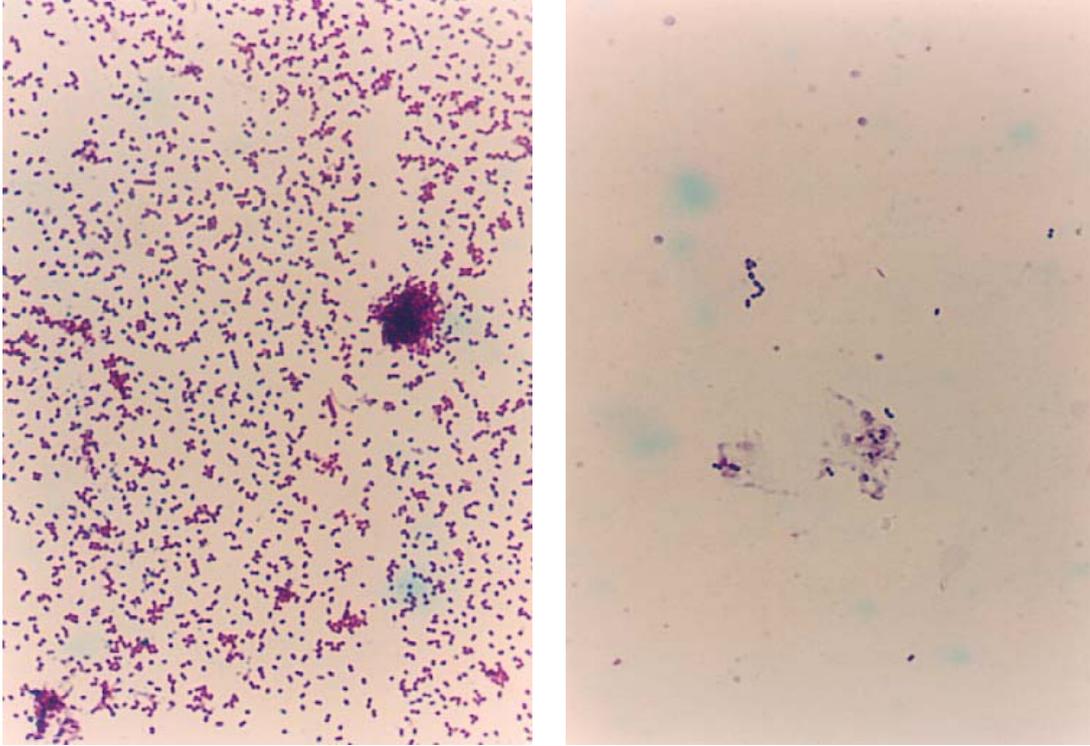


Figura 19: Efeito do AD sobre o crescimento de *Peptostreptococcus* sp. isolado de um animal submetido a DPE pelo método de Gram. A partir do crescimento de *Peptostreptococcus* sp. em meio líquido, foi realizada bacterioscopia pelo método de Gram. Observou-se um maior crescimento de bactérias Gram-positivas (*Peptostreptococcus* sp.) na lâmina feita a partir do tubo controle (TC) em comparação à lâmina do tubo teste(TT), o qual continha AD.



Figura 20: Efeito do AD sobre o crescimento de *Peptostreptococcus* sp. isolado de um animal submetido a DPE em meio de cultura sólido. O conteúdo do tubo controle (TC) e do tubo teste (TT), o qual continha AD, foi repicado em placa com ágar sangue. Após 48 horas de incubação em atmosfera de anaerobiose, verificou-se maior crescimento destas bactérias no lado onde foi repicado o conteúdo do tubo controle, comprovando o efeito inibitório do AD.

13. Efeito do Alendronato Dissódico (AD) sobre a variação de massa corpórea de ratas submetidas a DPE induzidas por corpo estranho

AD quando administrado 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia, foi capaz de prevenir a perda da massa corpórea dos animais com periodontite induzida em todos os tempos de forma comparável aos animais normais em relação aqueles submetidos a DPE e que receberam apenas salina. As ratas, nas quais foi administrado AD apenas a partir do 5º dia, apresentaram uma diminuição da perda de massa corpórea a partir do 7º de forma significativa em comparação ao grupo salina (Figura 21).

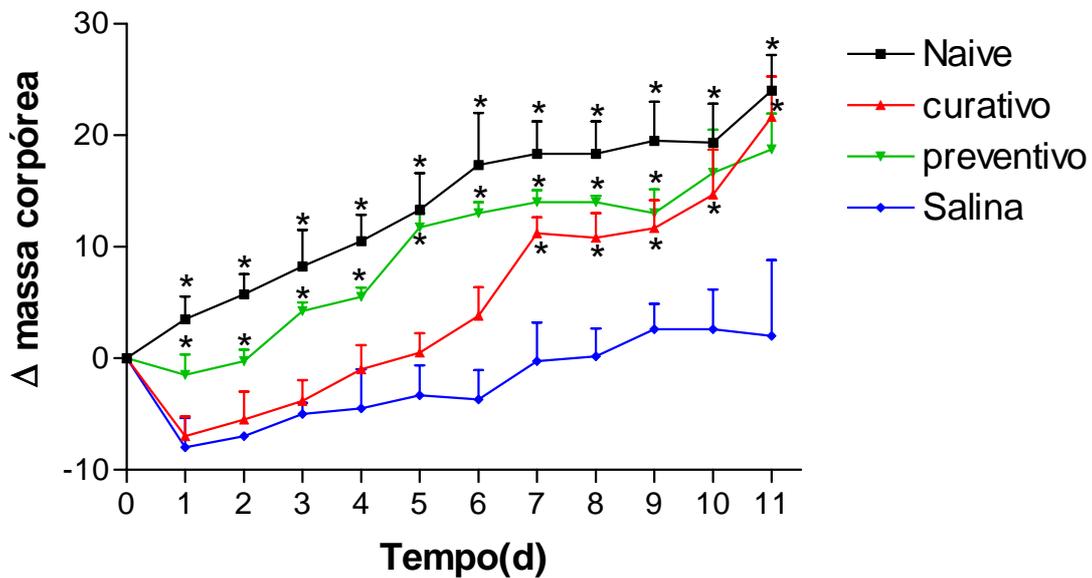


Figura 21: Efeito do Alendronato Dissódico sobre a variação de massa corpórea de ratas submetidas a doença periodontal experimental (DPE) induzida por corpo estranho. A DPE foi induzida pela inserção de fio de náilon em torno dos segundos molares dos animais. As massas corpóreas dos animais foram medidas imediatamente antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias. Os pontos representam média \pm EPM da variação de massa corpórea (g) calculada através das diferenças das massas dos animais em relação à massa inicial (ANOVA, Bonferroni).

IV. Discussão

IV. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença caracterizada pela extensiva perda óssea, sendo a maior causa de perda dentária nos adultos. Esta patologia tem sido tradicionalmente tratada por procedimentos mecânicos, tais como raspagem, alisamento e polimento radicular, associados ou não a procedimentos cirúrgicos, a fim de descontaminar a superfície radicular (GOLUB et al, 1998; MOMBELLI, 1999; LLAVANERAS et al, 2001; SALLUM et al, 2002). No entanto, esta abordagem provoca prejuízos ao tecido duro, o qual consiste em perda de substância dental, e recessão gengival. Além disso, a terapia mecânica pode não eliminar por completo os patógenos periodontais, pois os mesmos podem estar em áreas inacessíveis à abordagem mecânica (MOMBELLI, 1999).

Apesar da terapia periodontal mecânica trazer bons resultados na maioria dos casos, podem ocorrer resultados insatisfatórios, devido a persistência ou recrescimento de certos microrganismos em locais tratados, resultando em pacientes portadores de periodontites crônicas com colapso contínuo. Estas pessoas podem beneficiar-se com o uso de antimicrobianos sistêmicos (GOLUB et al, 1998; MOMBELLI, 1999; SALLUM et al, 2002).

Contudo, com o conhecimento de que a resposta do hospedeiro é fundamental para a ocorrência da doença, também se pode lançar mão de fármacos capazes de modular esta resposta, tais como antiinflamatórios não-esteroidais e bisfosfonatos (GOLUB et al, 1998; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

Os bisfosfonatos constituem uma nova classe de drogas, os quais são considerados potentes inibidores da reabsorção óssea, sendo bastante usados

como agentes terapêuticos em várias doenças ósseas metabólicas, tais como Doença de Paget, osteoporose, neoplasias malignas com metástases ósseas, entre outras (SAHNI et al, 1993; GARNERO et al, 2001; TÖYRÄS et al, 2003). Nos últimos anos, tem sido estudado o uso dos bisfosfonatos como coadjuvante na terapia periodontal (BRUNSVOLD et al, 1992; WEINREB et al, 1994; REDDY et al, 1995; MITSUTA et al, 2002; ALENCAR et al, 2002).

No presente estudo, buscou-se verificar o efeito do tratamento preventivo e curativo com o bisfosfonato alendronato dissódico (AD) bem como elucidar os mecanismos pelos quais esse fármaco atua na periodontite em modelo animal, comparando-o com um antimicrobiano já aceito, a doxiciclina. Para tal, a doença periodontal foi induzida através da inserção de fio de náilon 3.0 ao redor dos segundos molares superiores esquerdos de ratas Wistar, de acordo com modelo desenvolvido por vários autores (CRAWFORD et al, 1978; SALLAY et al, 1992; SAMEJIMA et al, 1990; KOIDE et al, 1995) e modificado no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA (BEZERRA et al, 2000; LIMA et al, 2000).

A estrutura e a organização do tecido periodontal da região de molares em ratos, incluindo epitélio gengival oral, epitélio sulcular oral, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais, cemento celular e acelular e osso alveolar, são muito semelhantes às do ser humano. A maior diferença consiste no fato de que o epitélio sulcular gengival dos ratos é queratinizado. Porém, estudos mostram que não se deve pensar que a barreira funcional gengival é diferente nos ratos e nos seres humanos, embora a extensão da área afetada seja maior no homem. Dessa forma, o modelo aqui utilizado foi capaz de reproduzir as principais características

encontradas na periodontite em humanos, sendo apropriado para o estudo dessa doença (BEZERRA et al, 2000; LIMA et al, 2000).

Neste trabalho, escolhemos o bisfosfonato alendronato dissódico (AD) em detrimento do clodronato, utilizado anteriormante em nosso laboratório por Alencar et al (2002) devido ao fato do AD ser mais potente, possuir apresentação para administração via oral através de comprimidos, ser de custo mais acessível e também ser facilmente adquirido comercialmente. A doxiciclina também foi escolhida não só devido à sua ação antimicrobiana, mas também ao seu efeito anticolagenolítico. Vários autores demonstram que o uso deste fármaco em dose subantimicrobiana é eficaz como coadjuvante no tratamento da periodontite, em virtude da inibição da atividade das metaloproteinases e, conseqüentemente, da destruição dos tecidos periodontais. Além disso, o uso de uma menor dose não contribui para a ocorrência de alterações na suscetibilidade da microflora periodontal, não ocorrendo, assim, a resistência bacteriana (CHANG et al, 1994; CROUT et al, 1996; CIANCIO, 1998; GOLUB et al, 1998; BEZERRA et al, 2000; CATON et al, 2001; GOLUB et al, 2001). Entretanto, estudos relatam que a resistência bacteriana pode ser resultado direto da ação do fármaco antimicrobiano e não, apenas, da seleção de microrganismos resistentes (TAVARES, 1996; FERES et al, 2002).

Aqui, de acordo com trabalhos anteriores (SALLAY et al, 1982; BEZERRA et al, 2000; LIMA et al, 2000), observou-se uma significativa perda óssea alveolar no 11º dia após a indução da doença periodontal experimental (DPE), a qual foi avaliada através do índice de perda óssea (IPO) e da análise histopatológica. De acordo com nossos achados, os autores citados anteriormente que induziram a

DPE da mesma forma, notaram que a perda óssea alveolar teve início a partir do 3º dia, alcançando valores máximos entre o 7º e o 11º dias.

No presente estudo, a administração de AD a partir do 5º dia após a indução de doença, ou seja, após o início da reabsorção óssea como tratamento curativo, mostrou-se capaz de reduzir de forma significativa o IPO, de forma comparável ao do AD administrado no mesmo dia da cirurgia, como tratamento preventivo e, também, de modo semelhante ao tratamento com a doxiciclina, tanto na dose antimicrobiana como na dose anticolagenolítica administrada, também, de forma curativa.

Os bisfosfonatos foram utilizados em vários estudos de periodontite como tratamento preventivo (BRUNSVOLD et al, 1992; MITSUTA et al, 2002) e também como tratamento curativo (REDDY et al, 1995; ALENCAR et al, 2002), os quais comprovam a diminuição da reabsorção óssea, que ocorre por meio da redução do *turnover* ósseo, diminuição do número e da atividade dos osteoclastos, inibição do recrutamento e da adesão dos osteoclastos através da alteração da morfologia destas células, ocorrendo a interrupção da formação da borda pregueada (FLEISCH, 2000). Porém, os autores citados anteriormente estudaram apenas os efeitos clínicos e histopatológicos dos bisfosfonatos, limitando-se à ação desta droga sobre os osteoclastos, sem estudar os mecanismos envolvidos no seu efeito.

Com finalidade de verificar se os dois medicamentos possuíam efeitos sinérgicos, administrou-se simultaneamente ambas as drogas apenas de modo curativo. Porém, nenhum efeito adicional no IPO foi verificado. Este efeito foi contraditório ao verificado por Llavaneras et al (2001), cujo estudo mostrou que a

associação de uma tetraciclina quimicamente modificada (CMT) e do clodronato reduzia de forma significativa o IPO em relação a terapia com apenas um dos dois fármacos. Provavelmente, este efeito ocorreu porque o AD, por nós utilizado, é mais de 10 vezes mais potente que o clodronato, usado no estudo supracitado, já se alcançando o efeito máximo com a dose utilizada. Em relação à doxiciclina, também não houve diferença quando usada sozinha, provavelmente porque mesmo quando ocorre a reabsorção do osso alveolar, com formação de seqüestros ósseos, as fibras do ligamento periodontal as quais estão preservadas em função do efeito da doxiciclina, sustentam esse osso, não sendo detectada diferença estatística no IPO.

Considerando a análise histopatológica, o periodonto de animais submetidos à DPE apresentou intenso infiltrado celular inflamatório no 11º dia após a cirurgia, além de destruição total do processo alveolar e destruição acentuada do cimento, achados que conferem com os estudos de Bezerra et al (2000); Lima et al (2000). Adicionalmente, aos dados anteriores, nós mostramos, através de uma coloração especial, uma acentuada destruição das fibras colágenas. O AD foi capaz de reduzir a reabsorção do osso alveolar e do cimento radicular, além de preservar de modo parcial a destruição das fibras colágenas do ligamento periodontal, tanto usado de forma preventiva como curativa. Este efeito também foi análogo ao encontrado com o uso da menor dose da doxiciclina. Com a maior dose de doxiciclina, houve uma melhor preservação das fibras colágenas quando comparado com a dose menor. Contudo, a preservação ideal pôde ser obtida com o uso da associação de ambos os medicamentos.

Ainda analisando os achados histopatológicos nesse estudo, observou-se na 6ª hora após a cirurgia um intenso infiltrado celular inflamatório com predomínio de polimorfonucleares, com presença também de mononucleares no tecido gengival, inclusive no próprio epitélio (dado não mostrado), além de hemorragia e edema. O aumento do infiltrado neutrofílico na 6ª hora após a indução da DPE foi confirmado através da realização da medida da MPO, enzima neutrofílica, a qual encontrou-se aumentada na 6ª hora. Estes dados estão de acordo com os achados do leucograma que mostram uma neutrofilia na 6ª hora. Provavelmente, esta neutrofilia resulta de um efeito sistêmico do processo inflamatório local. A administração de AD previamente à cirurgia, promoveu uma redução acentuada do infiltrado neutrofílico na 6ª hora, sugerindo um efeito inibitório deste bisfosfonato na migração dos leucócitos PMNs. Esses dados estão de acordo com Tani-Ishii et al (2003), que verificaram uma diminuição significativa da infiltração de leucócitos PMNs em tecido gengival de ratos após tratamento com incadronato, o qual possui semelhança química com o AD, sendo ambos aminobisfosfonatos.

Vale ressaltar que os leucócitos PMNs consistem na primeira linha de defesa do organismo, os quais são fundamentais na preservação do periodonto, pois além de realizarem fagocitose, liberam substâncias inflamatórias e antibacterianas capazes de eliminar os microrganismos (ÖVER et al, 1993; MIYASAKI & NEMIROVSKIY, 1997). Contudo, o papel dos neutrófilos pode ser considerado “uma espada de dois gumes”, pois além de proteger, pode promover a destruição tecidual, através da liberação de enzimas, radicais reativos de oxigênio e, também, de citocinas (GALBRAITH et al, 1997; LIU et al, 2001).

A redução na migração de neutrófilos pelo AD foi confirmada através do modelo de peritonite, onde observou-se que a administração prévia de AD reduziu de forma significativa a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal estimulada com Carragenina. De acordo com o dado anterior, foi também constatada no leucograma, a redução do número de neutrófilos e da leucocitose 6 horas após a cirurgia em animais que receberam AD previamente à mesma.

Um outro achado que demonstra o efeito inibitório do AD na migração de leucócitos PMNs é a verificação da atividade de MPO. A atividade desta enzima foi reduzida de forma significativa através da análise da absorbância nos tempos 0, 30 segundos, 1 e 3 minutos. Esses dados são consistentes com estudo de Kowolik et al (1991), que mostrou a redução da atividade da MPO pelo etidronato, o qual, assim como o alendronato, não possui cloro na sua estrutura. De acordo com o mesmo autor, o cloro na molécula da droga intensifica a atividade de MPO, como é o caso do clodronato, um bisfosfonato que contém cloro na sua composição.

Com isso, este trabalho mostrou que o AD diminui a resposta inflamatória inicial, o que pode refletir também nas conseqüências posteriores da doença periodontal, como reabsorção óssea e do cimento.

Desde que osteoclastos e macrófagos pertencem ao sistema mononuclear fagocítico, seria esperado que os bisfosfonatos não afetassem somente o metabolismo ósseo, mas também a resposta inflamatória (PIETSCHMANN et al, 1998). Dessa forma, o AD além de ter inibido a migração de neutrófilos, também reduziu a infiltração de mononucleares. Fato este observado na gengiva dos animais com 11 dias de DPE, nos quais foi

administrado AD tanto de forma curativa como preventiva, mostrando que os mesmos apresentavam redução do infiltrado celular inflamatório com predomínio de mononucleares, embora havendo ainda presença também de eosinófilos e mastócitos, porém com redução do número de neutrófilos. Como reflexo sistêmico desta redução da inflamação local, observamos no leucograma, uma redução da leucocitose bem como da monocitose dos animais tratados com AD. Da mesma forma, constatou-se uma diminuição do infiltrado celular no periodonto de animais tratados com AD após 11 dias da indução da DPE.

De acordo com Pietschmann et al (1998), o AD aumentou significativamente a porcentagem de mononucleares que migraram através do endotélio dos vasos, contudo os mesmos autores demonstram que o tratamento com AD não alterou o ritmo de migração subsequente das células mononucleares, sugerindo, assim, que o AD possui um mecanismo próprio que influenciaria a migração transendotelial das células mononucleares do sangue periférico *in vitro*. O trabalho de Nakamura et al (1996) relata que houve exacerbação da artrite em camundongos com o uso de um aminobisfosfonato, sugerindo que este efeito pode ser por causa da estimulação da síntese de histamina e, também, pelo aumento do número de macrófagos. Pietschmann et al (1998), em seu estudo, mostraram que o AD induziu a proliferação de células mononucleares *in vitro*. A aparente contradição entre os nossos dados e os dados apresentados por estes autores poderia ser explicado pelo efeito antimicrobiano do AD mostrado no presente trabalho. A inibição do crescimento bacteriano reduziria a resposta inflamatória do hospedeiro, diminuindo, portanto, a inflamação aguda e crônica,

sendo que este efeito antibacteriano superaria qualquer atividade pró-inflamatória do aminobisfosfonato.

Adicionalmente, no nosso trabalho demonstramos que a DPE induziu um aumento de IL-1 β no tecido gengival após 6 horas da indução da doença. Estudos anteriores mostram que, na doença periodontal, há um aumento da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β), a qual pode ser produzida por diferentes células, tais como monócitos, macrófagos e, também, por neutrófilos (KJELDSEN et al, 1995; MILLER et al, 1996). A administração prévia do AD nos animais não inibiu a produção desta citocina, ao contrário, IL-1 β foi produzida de forma comparável aos animais que receberam apenas salina e de forma estatisticamente diferente dos animais sem a doença, nos quais não houve produção da enzima. Este achado está de acordo com trabalhos realizados por Mönkkönen; Makkonen (1995); Mönkkönen et al (1998); Töyräs et al (2003), os quais mostram que o AD não reduz a síntese de citocinas, ao contrário, é capaz de aumentar a produção de citocinas, tais como IL-1 β , TNF e IL-6.

Demonstramos aqui também que havia TNF armazenado dentro dos mastócitos e mononucleares, indicando que em tecido gengival sem doença periodontal, esta citocina já existe, o que é consistente com o fato de que a cavidade oral é naturalmente contaminada e que os mastócitos possuem normalmente TNF pré-fabricado dentro de seus grânulos (TRACEY; CERAMI, 1994). Lima et al (2000) demonstraram que o TNF amplifica a resposta inflamatória local causando destruição tecidual e perda óssea na doença periodontal experimental. Observamos na 6^a hora que o AD administrado

previamente à cirurgia promoveu uma diminuição da marcação para TNF em neutrófilos e mononucleares do tecido gengival por imunohistoquímica em relação ao tecido dos animais que não receberam AD. A imunohistoquímica realizada em tecido gengival de animais tratados de forma curativa e preventiva demonstrou também redução da marcação para TNF em mastócitos e mononucleares no 11º dia. Estes achados sugerem um efeito antiinflamatório do AD reduzindo a infiltração celular aguda e crônica, bem como a expressão local de TNF. Estes dados são contraditórios com o fato de que o AD, sendo um aminobisfosfonato, atuaria como droga pró-inflamatória, intensificando a produção de citocinas, tais como IL-1, TNF e IL-6 (MÖNKKÖNEN; MAKKONEN, 1995; MÖNKKÖNEN et al, 1998; TÖYRÄS et al, 2003). No entanto, estes fatos divergentes podem resultar da redução da proliferação bacteriana no local como conseqüência do efeito antimicrobiano do AD mostrado neste trabalho.

Neste estudo, também foi analisado a variação de massa corpórea dos animais submetidos à DPE. Verificou-se perda significativa de massa corpórea dos animais no primeiro dia após a indução da doença, provavelmente devido ao trauma provocado pelo ato cirúrgico, ocasionando um processo inflamatório agudo, o qual dificultaria a alimentação dos animais. Após o primeiro momento, ocorreu um ganho lento da massa corpórea nos animais que receberam apenas salina, com retorno do peso aos níveis iniciais. Contudo, nos animais nos quais foi administrado AD de forma preventiva, observou-se ganho progressivo de peso de forma significativa em relação com o grupo com DPE tratado com salina em todos os tempos avaliados. Nos animais que receberam AD de forma curativa, observou-se ganho de peso significativo a partir do 6º dia, resultando ainda em

uma curva ponderal diferente da dos animais sem a doença. Esses achados são consistentes com o trabalho de Lima et al (2000), no qual afirma que após os animais perderem 10% de seu peso no primeiro dia depois da indução da doença, retornaram ao peso inicial. Contudo, Koide et al (1995), demonstraram que a perda de peso ocorreu nos três primeiros dias após a cirurgia. Esta divergência, provavelmente, decorre da diferença da técnica utilizada.

Além deste trabalho analisar a modulação da resposta do hospedeiro pelo AD, também foi avaliado o efeito deste fármaco sobre as bactérias periodontopatogênicas, as quais são essenciais para o desenvolvimento da periodontite.

Inicialmente, investigamos as bactérias que fazem parte da microbiota normal da cavidade oral dos ratos e as que colonizam o periodonto destes animais após a indução da doença. Observou-se neste trabalho que a microbiota em ratos submetidos à doença periodontal experimental é diferente da flora de animais sem a doença, sendo formada predominantemente de bactérias Gram-negativas anaeróbicas, dentre as quais destacamos *Fusobacterium nucleatum* e bacilos Gram-negativos pigmentados. Segundo a literatura, estes bacilos Gram-negativos pigmentados compreendem os gêneros *Porphyromonas* sp e *Prevotella* sp. Nossos dados confirmam estudos anteriores (KLAUSEN, 1991; MORENO et al, 1999) que mostram que há alteração na constituição microbiológica na doença periodontal semelhante ao encontrados por nós, sendo estes microrganismos periodontopatogênicos (*Fusobacterium nucleatum*, bacilos Gram-negativos pigmentados, entre outros) presentes tanto em humanos como em ratos.

No presente estudo, surpreendentemente, notamos que o AD inibiu o crescimento das bactérias características da doença periodontal, pois em nenhum animal que recebeu AD foi observado o crescimento de bacilos Gram-negativos pigmentados. Houve crescimento de *Fusobacterium nucleatum* em apenas dois de nove animais (23%) com DPE e nos quais foi administrado AD. Apesar deste achado, o AD inibiu o crescimento desta bactéria em 77% dos animais, sendo este dado significativo em relação aos animais que não receberam AD. Provavelmente, o crescimento de *Fusobacterium nucleatum* em 23% dos animais deve-se ao fato do AD não se dissolver completamente no veículo utilizado, o que pode ter dificultado o alcance de concentrações antimicrobianas no periodonto.

Para melhor caracterizar o efeito antimicrobiano do AD, foi isolado dos próprios animais com periodontite, microrganismos do gênero *Peptostreptococcus*, sp os quais são representantes das bactérias anaeróbias Gram-positivas. Estes microrganismos estão implicados com a doença periodontal e têm sido detectados freqüentemente em grande quantidade em sítios ativos de destruição periodontal quando comparados com sítios saudáveis ou apenas com gengivite. Vale ressaltar que, em sítios periodontais tratados com sucesso, os níveis e a freqüência desta espécie encontram-se diminuídos (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1999).

A partir do isolamento desta bactéria, foi realizado teste de cultura em meio líquido, utilizando-se dois tubos de ensaio, onde em um destes continha apenas o meio de cultura BHI e no outro havia BHI e AD. Por meio das diferentes turvações observadas nos dois tubos e comparando-as com as turvações da escala McFarland, observou-se que o AD realmente inibiu o crescimento de *Peptostreptococcus* sp. A partir deste experimento, foi feita bacterioscopia pelo

método de Gram seguida da repicção em placa com ágar-sangue. Na bacterioscopia, foi observado na lâmina correspondente ao tubo sem AD uma quantidade significativamente maior de *Peptostreptococcus*, os quais coram-se pela coloração de Gram pelo fato de serem Gram-positivos, em relação à lâmina que corresponde ao tubo que continha AD. A placa onde foi realizado o repicado em meio de cultura sólido também confirmou os dados obtidos anteriormente.

Infelizmente, devido à limitação da metodologia utilizada no presente estudo, não foi possível a realização do teste descrito anteriormente com bacilos Gram-negativos pigmentados, pois estes possuem uma exigência maior em relação à atmosfera de crescimento.

De posse desses dados, fomos pesquisar na literatura e encontramos, em trabalhos recentes que alguns fármacos que normalmente são usados em patologias não infecciosas têm mostrado alguma atividade antimicrobiana *in vitro*. Essas drogas são denominadas “não-antibióticos”. Entre estas drogas, encontram-se os bisfosfonatos (KRUSZEWSKA et al, 2002).

Recentemente, também foi demonstrado o efeito antimicrobiano do AD sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (MONTALVETTI et al, 2001) e, também, sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi* (KRUSZEWSKA et al, 2002). Outros bisfosfonatos foram capazes de inibir o crescimento de uma nanobactéria, a qual foi descoberta em rins de pacientes com doença renal policística (ÇİFTÇÍOĞLU et al, 2002). Já um trabalho um pouco mais antigo mostrava que alguns bisfosfosnatos possuíam capacidade de inibir o crescimento de *Streptococcus mutans* (HSU et al, 1995). Porém, ainda não havia sido

mostrada a ação do AD sobre as bactérias periodontopatogênicas anaeróbias estritas.

Portanto, os dados apresentados no presente trabalho mostram que o AD possui ações relevantes, verificadas tanto na microbiota envolvida na DPE quanto na resposta do hospedeiro, podendo, assim, ser considerado um medicamento promissor para o tratamento da periodontite, sendo necessário estudos clínicos em humanos.

V. Conclusões

V. CONCLUSÕES

- Alendronato Dissódico, utilizado tanto de forma preventiva como de forma curativa, reduziu o índice de perda óssea, de forma comparável à doxiciclina, porém não houve amplificação do efeito sobre o índice de perda óssea com a associação de ambos.
- Alendronato Dissódico reduziu a destruição das fibras colágenas do ligamento periodontal e da gengiva de forma similar à doxiciclina.
- Alendronato Dissódico reduziu o infiltrado inflamatório neutrofílico e a MPO na 6ª hora da doença, assim como a infiltração de células mononucleares e a expressão de TNF por imunohistoquímica no 11º dia.
- Alendronato Dissódico inibiu o crescimento de bactérias características da doença periodontal, tais como pigmentados e *Fusobacterium nucleatum*.

VI. Referências Bibliográficas

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, V. B. M.; BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ABREU, A. L. C.; BRITO, G. A. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 251-256, 2002.

ALEXANDER, D. C. C.; MARTIN, J. C.; KING, P. J.; POWELL, J. R.; CAVES, J.; COHEN, M. E. Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 755-762, 1996.

BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ALENCAR, V. B. M.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. R. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in rats experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1009-1014, 2000.

BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. R. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 613-616, 2002.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 474-484, 1993.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRETZ, W. A. Comportamento do hospedeiro e as doenças periodontais. **Revista da APCD**, v. 50, n. 5, p. 428-433, 1996.

BRUNSVOLD, M. A.; CHAVES, E. S.; KORNMANN, K. S.; THOMAS, B. A.; WOOD, R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 825-830, 1992.

CAO, C. F.; SMITH, Q. T. Crevicular fluid myeloperoxidase at health, gingivitis and periodontitis sites. **J Clin Periodontol**, v. 16, p. 17-20, 1989.

CHANG, K. M.; RAMAMURTHY, N. S.; MCNAMARA, T. F.; EVANS, R. T.; KLAUSEN, B.; MURRAY, P. A.; GOLUB, L. M. Tetracyclines inhibit Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in rats by a non-antimicrobial mechanism. **J. Periodont. Res.**, v. 29, p. 242-249, 1994.

CATON, J. G.; CIANCIO, S. G.; BLIEDEN, T. M.; BRADSHAW, M.; CROUT, R. J.; HEFTI, A. F.; MASSARO, J. M.; POLSON, A. M.; THOMAS, J.; WALKER, C. Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planning: post-treatment effects. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 782-789, 2001.

CIANCIO, S. G. Tetracyclines and periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 47, n. 3, p. 155-159, 1976.

CIANCIO, S. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. **Adv. Dent. Res.**, v. 12, p. 27-31, 1998.

CRAWFORD, J. M.; TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. **J. Periodontol. Res.**, v. 13, p. 316-325, 1978.

CROUT, R. J.; LEE, H. M.; SCHROEDER, K.; CROUT, H.; RAMAMURTHY, N. S.; WIENER, M.; GOLUB, L. M. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 506-514, 1996.

ÇİFTÇİOĞLU, N.; MILLER-HJELLE, M. A.; HJELLE, J. T.; KAJANDER, E. O. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 7, p. 2077-2086, 2002.

DAHAN, M.; NAWROCKI, B.; ELKAIM, R.; SOELL, M.; BOLCATO-BELLEMIN, A.; BIREMBAUT, P.; TENENBAUM, H. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingival. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 128-136, 2001.

D'AGOSTINO, P.; FERLAZZO, V.; MILANO, S.; LA ROSA, M.; DI BELLA, G.; CARUSO, R.; BARBERA, C.; GRIMAUDO, S.; TOLOMEO, M.; FEO, S.; CILLARI, E. Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines the inhibition of nitric oxide and interleukin-12 synthesis in J774 cell line. **International Immunopharmacology**, v. 1, 1765-1776, 2001.

EBERSOLE, J. L.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontology 2000**, v. 23, p. 19-49, 2000.

EZRA, A.; GOLOMB, G. Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 42. p. 175-195, 2000.

EVANS, C.E. Bisphosphonates modulate the effect of macrophage-like cells on osteoblast. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 554-563, 2002.

FERES, M.; HAFFAJEE, A. D.; ALLAR, K.; SOM, S.; GOODSON, J. M.; SOCRANSKY, S.S. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, n. 8, p. 724-735, 2002.

FLEISCH, H. Bisphosphonate – preclinical. *In*: FLEISCH, H. **Bisphosphonates in bone disease**. California: Academic Press, 2000. chap. 2 , p. 27-66.

FREDRIKSSON, M.; BERGSTRÖM, K.; ASMAR, B. IL-8 and TNF $-\alpha$ from peripheral neutrophils and acute-phase proteins in periodontitis. Effect of cigarette smoking: a pilot study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p. 123-128, 2002.

FRITH, J. C.; MÖNKKÖNEN, J.; AURIOLA, S.; MÖNKKÖNEN, H.; ROGERS, M. J. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and anti-inflammatory drug clodronate. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 9, p. 2201-2210, 2001.

GALBRAITH, G. M. P. ; HAGAN, C.; STEED, R. B.; SANDERS, J. J.; JAVED, T. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 68, p. 832-838, 1997.

GARNERO, P.; CHRISTGAU, S.; DELMAS, P. D. The bisphosphonate zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. **Bone**, v. 28, n. 5, p. 461-464, 2001.

GENCO, R. J. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. **J. Periodontol.**, v. 52, n. 9, p. 545-558, 1981.

GENCO, R. J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 338-355, 1992.

GETKA, T. P.; ALEXANDER, D. C. C.; PARKER, W. B.; MILLER, G. A. Immunomodulatory and superantigen activities of bacteria associated with adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 909-917, 1996.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; LEHRER, G.; NEMIROFF, A.; MCNAMARA, T. F.; KAPLAN, R.; RAMAMURTHY, N. S. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **J. Periodont. Res.**, v. 18, p. 516-526, 1983.

GOLUB, L. M.; GOODSON, J. M.; LEE, H. M.; VIDAL, A. M.; MCNAMARA, T. F.; RAMAMURTHY, N. S. Tetracyclines inhibits tissue collagenases. Effects of ingested low-dose and local delivery systems. **J. Periodontol.**, v. 56, p. 93-97, 1985.

GOLUB, L. M.; MCNAMARA, T. F.; D'ANGELO, G.; GREENWALD, R. A.; RAMAMURTHY, N. S. A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 8, p. 1310-1314, 1987.

GOLUB, L. M.; RYAN, M. E.; WILLIAMS, R. C. Modulation of the host response in the treatment of periodontitis. **Dent. today**, v. 17, n. 10, p. 102-109, 1998.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; RYAN, M. E. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by múltiple non-antimicrobial mechanisms. **Adv. Dent. Res.**, v. 12, p. 12-16, 1998.

GOLUB, L. M.; MCNAMARA, T. F.; RYAN, M. E.; KOHUT, B.; BLIEDEN, T.; PAYONK, G.; SIPOS, T.; BARON, H. J. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenases activity and attachment loss in adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, 146-156, 2001.

HEIKKILA, P.; TERONEN, O.; MOILANEN, M.; KONTTINEN, Y. T.; HANEMAAIJER, R.; LAITINEN, M.; MAISI, P.; PLUIJM, G.; BARTLETT, J. D.; SALO, T.; SORSA, T. Bisphosphonates inhibits stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. **Anti-cancer drugs**, v. 13, p. 245-254, 2002.

HIRAGA, T.; TANAKA, S.; YAMAMOTO, M.; NAKAJIMA, T.; OZAWA, H. Inibitory effects of bisphosphonate (YM175) on bone resorption induced by a metastatic bone tumor. **Bone**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 1996.

HOLMSTRUP, P. Anatomia macroscópica do periodonto. *In*: WILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. **Fundamentos de periodontia**. São Paulo: Quintessence editora, 2001, cap. 3, p. 17-26.

HOLMSTRUP, P. Anatomia microscópica do periodonto. *In*: WILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. **Fundamentos de periodontia**. São Paulo: Quintessence editora, 2001, cap. 4, p. 27-46.

HSU, M. T.; STURR, G.; CURRAN, T. M.; MARQUIS, R. E. Inhibition of streptococcal growth, F-ATPase and pyrophosphatase by diphosphonates. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 47-53, 1995.

HU, J. H.; DING, M.; SOBALLE, K.; BECHTOLD, J. E.; DANIELSEN, C. C.; DAY, J. S.; HVID, I. Effects of short-term alendronate treatment on the three-dimensional microstructural, physical, and mechanical properties of dog trabecular bone. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 591-597, 2002.

INGMAN, T.; SORSA, T.; SUOMALAINEN, K.; HALINEN, S.; LINDY, O.; LAUHIO, A.; SAARI, H.; KONTTINEN, Y. T.; GOLUB, L. M. Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 82-88, 1993.

ITO, M.; AMIZUKA, N.; NAKAJIMA, T.; OZAWA, H. Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. **Bone**, v. 25, n. 4, p. 447-452, 1999.

KAPUSNIK-UNER, J. E.; SANDE, M. A.; CHAMBERS, H. F. Fármacos antimicrobianos (continuação) – tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina e outros fármacos antibacterianos. *In*: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996, cap. 45, p. 789-811.

KJELDTSEN, M.; HOLMSTRUP, P.; LINDEMANN, R. A.; BENDTZEN, K. Bacterial-stimulated cytokine production of peripheral mononuclear cells from patients of various periodontitis categories. **J. Periodontol.**, v. 66, p. 139-144, 1995.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 59-73, 1991.

KOBAYASHI, M.; OKADA, N.; OKAMATSU, Y.; MUGIKURA, K.; NISHIHARA, T.; HANAZAWA, S.; KITANO, S.; HASEGAWA, K. Intracellular interleukin-1 α production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 4, p. 840-849, 1999.

KOIDE, M.; SUDA, S.; SAITON, S.; OFUJI, Y.; SUZUKI, T.; YOSHIE, H.; TAKAI, M.; ONO, Y.; TANIGUCHI, Y.; HARA, K. In vivo administration of IL-1 β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, p. 420-434, 1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Micobactérias. *In*: KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido. São Paulo: MEDSI, 5ª edição, 2001, xap. 17, p. 903-963.

KORNMAN, K. S.; KARL, E. H. The effect of long-term low-dose tetracycline therapy on the subgingival microflora in refractory adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 53, n. 10, p. 604-610, 1982.

KORNMAN, K. S. A patogenia das doenças periodontais: uma observação a mais. *In*: WILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. **Fundamentos de periodontia**. São Paulo: Quintessence editora, 2001, cap. 1, p. 3-7.

KOWOLIK, M. J.; HYVÖNEN, P. M. The effect of dichloromethylene bisphosphonate on human gingival crevicular neutrophil myeloperoxidase activity. **Archs Oral Biol.**, v. 35, suppl., p. 201S-203S, 1990.

KOWOLIK, M. J.; HYVÖNEN, P. M.; SUTHERLAND, R.; RAEBURN, J. A. The effect of two bisphosphonates on human neutrophil chemiluminescence and myeloperoxidase activity. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 6, p. 223-226, 1991.

KRUSZEWSKA, H; ZAREBA, T.; TYSKI, S. Search of antimicrobial activity of selectes non-antibiotic drugs. **Acta Pol. Pharm.**, v. 59, n. 6, p. 436-439, 2002.

LEITÃO, R. F. C. Estudo do papel do óxido nítrico na doença periodontal experimental. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2002.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 000, p. 1-7, 2000.

LIMA, V.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of TNF-alpha inhibitors pentoxifyline and thalidomide on the alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol.**, 2003, in press.

LIN, J. H. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 75-85, 1996.

LINDHE, J.; KARRING, T. A anatomia do periodonto. *In*: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 1, p. 1-42.

LIU, R. K.; CAO, C. F.; MENG, H. X.; GAO, Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissue from generalized aggressive periodontitis. **J Periodontol**, v. 72, n. 11, p. 1545-1553, 2001.

LISSONI, P.; CAZZANIGA, M.; BARNI, S.; PEREGO, M. S.; BRIVIO, F.; FUMAGALLI, L.; TANCINI, G. Acute effects of pamidronate administration on serum levels of interleukin-6 in advanced solid tumour patients with boné

metástases and their possible implications in the immunotherapy of câncer with interleukin-2. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 2, p. 304-306, 1997.

LLAVANERAS, A.; RAMAMURTHY, N. S.; HEIKKILA, P.; TERONEN, O.; SALO, T.; RIFKIN, B. R.; RYAN, M. E.; GOLUB, L. M.; SORSA, T. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 8, p. 1069-1077, 2001.

LOHINAI, Z.; STACHLEWITZ, R.; SZÉKELY, A. D.; FEHÉR, E.; DÉZSI, L.; SZABÓ, C. Evidence for the expresión of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. **Life Sciences**, v. 70, p. 279-290, 2001.

MAKKONEN, N.; HIRVONEN, M. R.; TERÄVÄINEN, T.; SAVOLAINEN, K.; MÖNKKÖNEN. Different effects of three bisphosphonates on nitric oxide production by macrophages. **Bone**, v. 17, n. 6, p. 603, 1995.

MEYLE, J. Neutrophil chemotaxis and serum concentration of tumor-necrosis-factor- α (TNFA). **J. Periodont. Res.**, v. 28, p. 491-493, 1993.

MILLER, G. A.; DEMAYO, T.; HUTTER, J. W. Production of interleukin-1 by polymorphonuclear leukocytes resident in periradicular tissue. **J. Endodon.**, v. 22, n. 7, p. 346-35, 1996.

MITSUTA, T.; HORIUCHI, H.; SHINODA, H. Effects of topical administration of clodronate on alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 479-486, 2002.

MIYASAKI, K. T.; NEMIROVSKIY, E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 12, p. 27-32, 1997.

MOMBELLI, A. Antibióticos em terapia periodontal. *In*: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 17, p. 350-363.

MÖNKKÖNEN, J.; PENNANEN, N.; LAPINJOKI, S.; URTTI, A. Clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) inhibits LPS-stimulated IL-6 and TNF production by RAW 264 cells. **Life Sciences**, v. 54, n. 14, p. 229-234, 1994.

MÖNKKÖNEN, J.; MAKKONEN, N. Effects of alendronate on macrophage growth and pro-inflammatory cytokine production. **Bone**, v. 17, n. 6, p. 603, 1995.

MÖNKKÖNEN, J.; SIMILÄ, J.; ROGERS, M. J. Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages *in vitro*. **Life Sciences**, v. 62, n. 8, p. 95-102, 1998.

MONTALVETTI, A.; BAILEY, B. N.; MARTIN, M. B.; SEVERIN, G. W.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 36, p. 33930-33937, 2001.

MORENO, M.; ROMERO, P.; NIEVES, B.; SALAZAR, M.; BURGUERA, L. Microbiological characteristics of adult periodontitis associated with anaerobic bacteria. **Anaerobe**, v. 5, p. 261-262, 1999.

MUNDY, G.R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **J. Periodontol.**, v. 26, p. 213-217, 1991.

NAKAMURA, M.; ANDO, T.; ABE, M.; KUMAGAI, K.; ENDO, Y. Contrast between effects of aminobisphosphonates on collagen-induced arthritis in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, n. 2, p. 205-212, 1996.

NAKAYA, H.; OSAWA, G.; IWASAKI, N.; COCHRAN, D.L.; KAMOI, K.; OATES, T.W. Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 7, p. 1158-1166, 2000.

NELSON, M. L. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. **Adv. Dent. Res.**, v. 12, p. 5-11, 1998.

ÖVER, C.; YAMALIK, N.; YAVUZYLMMAZ, E.; ERSOY, F.; ERATALAY, K. Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 35, p. 235-240, 1993.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 52 , n. 9, p. 477-491, 1981.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 239-252, 2000.

PIETSCHMANN, P.; STOHLAWETZ, P.; BROSCHE, S.; STEINER, G.; SMOLEN, J. S.; PETERLIK, M. The effect of alendronate on cytokine production, adhesion molecule expression, and transendothelial of human peripheral blood mononuclear cells. **Calcif. Tissue Int.**, V. 63, n. 4, p. 325-330, 1998.

POURTAGHI, N.; RADVAR, M.; MOONEY, J.; KINANE, D. F. The effect of subgingival antimicrobial therapy on the levels of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases in gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 866-870, 1996.

PREISS, D. S.; MEYLE, J. Interleukin-1 β concentration of gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, v. 65, p. 423-428, 1994.

REDDY, M. S.; WEATHERFORD, T. W.; SMITH, C. A.; WEST, B. D.; JEFFCOAT, M. K.; JACKS, T. M. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. **J. Periodontol.**, v. 66, p. 211-217, 1995.

RODRIGUES, A. M.; NEWMAN, M. G. Microbiologia e imunologia periodontal. *In*: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Periodontia/ cirurgia/ cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002, cap. 2, p. 21-50.

ROSSOMANDO, E. F.; KENNEDY, J. E.; HADJIMICHAEL, J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, n. 6, p. 431-434, 1990.

ROSSOMANDO, E. F.; WHITE, L. A novel method for the detection of TNF-alpha in gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, n. 64, p. 445-449, 1993.

RYAN, M. E.; ASHLEY, R. A. How do tetracyclines work? **Adv. Dent. Res.**, v. 12, p. 149-151, 1998.

RYAN, M. R.; GOLUB, L. M. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as treatment strategy. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 226-238, 2000.

SAHNI, M.; GUENTHER, H. L.; FLEISCH, H.; COLLIN, P.; MARTIN, T. J. Bisphosphonate act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2004-2011, 1993.

SALLAY, K.; SANAVI, F.; RING, I.; PHAM, P.; BEHLING, U. H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodont. Res.**, v. 17, p. 263-274, 1982.

SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z.; NOCITI JR.; F. Benefícios do tratamento químico/medicamentoso das lesões periodontais. *In*: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Periodontia/ cirurgia/ cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002, cap. 4, p. 65-75.

SAMEJIMA, Y. EBISU, S.; OKADA, H. Effect of injection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodont. Res.**, v. 25, p. 308-315, 1990.

SANDROS, J.; KARLSSON, C.; LAPPIN, D. F.; MADIANOS, P. N.; KINANE, D. F.; PAPAPANOU, P. N. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 10, p. 1808-1814, 2000.

SHIBUTANI, T.; INUDUKA, A.; HORIKI, I.; LUAN, Q.; IWAYAMA, Y. Bisphosphonate inhibits alveolar bone resorption in experimentally-induced peri-implantitis in dogs. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 12, p. 109-114, 2001.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbiologia da doença periodontal. *In*: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 4, p. 92-126.

TANI-ISHII, N.; MINAMIDA, G.; SAITOH, D.; CHIEDA, K.; OMURO, H.; SUGAYA, A.; HAMADA, N.; TAKAHASHI, Y.; KIYOHARA, S.; KASHIMA, I.; TERANAKA, T.; UMEMOTOT, T. Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by Porphyromonas gingivalis infection. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 5, p. 603-609, 2003.

TANNER, A. C. R.; TAUBMAN, M. A. Microbiota of initial periodontitis in adults. **Anaerobe**, v. 5, p. 229-235, 1999.

TAVARES, W. Resistência bacteriana. *In*: TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Editora Atheneu, 1996, p. 43-85.

TENENBAUM, H. C.; SHELEMAY, A.; GIRARD, B.; ZOHAR, R.; FRITZ, P. C. Bisphosphonates and periodontics: potencial applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 7, p. 813-822, 2002.

TERONEN, O.; KONTTINEN, Y. T.; SALO, T.; INGMAN, T.; SORSA, T. Clodronate inhibits MMP-1 and MMP-8 in GCF and PISF. **Bone**, v. 17, n. 6, p. 605, 1995.

TERONEN, O.; KONTTINEN, Y. T.; LINDQVIST, C.; SALO, T.; INGMAN, T.; LAUHIO, A.; DING, Y.; SANTAVIRTA, S.; SORSA, T. Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. **J. Dent. Res.**, v. 76, n. 9, p. 1529-1537, 1997.

THOMAS, J. G.; METHENY, R. J.; KARAKIOZIS, J. M.; WETZEL, J. M.; CROUT, R. J. Long-term sub-antimicrobial doxycycline (periostat®) as adjunctive management in adult periodontitis: effects on subgingival bacterial population dynamics. **Adv. Dent. Res.**, v. 12, p. 32-39, 1998.

TÖYRÄS, A.; OLLIKAINEN, J.; TASKINEN, M.; MÖNKKÖNEN, J. Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate-induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2003, in press.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annu. Rev. Med.**, v. 45, 491-503, 1994.

YAMALIK, N.; ÇAGLAYAN, F.; KILINÇ, K.; KILINÇ, A.; TÜMER, C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J Periodontol**, v. 71, n. 3, p. 460-467, 2000.

WEINREB, M.; QUARTUCCIO, H.; SEEDOR, J. G.; AUFDEMORTE, T. B.;
BRUNSVOLD, M.; CHAVES, E.; KORNMAN, K. S.; RODAN, G. A.
Histomorphometrical análisis of the effects of the bisphosphonate alendronate on
bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. **J. Periodont. Res.**, v.
29, p. 35-40, 1994.