

VIVIANNE CARVALHO DA CUNHA TRAJANO

**GEL DE DOXICICLINA ENCAPSULADA EM  $\beta$ -CICLODEXTRINA  
COMO AGENTE TÓPICO ADJUVANTE PARA O TRATAMENTO  
NÃO CIRÚRGICO DA PERIODONTITE CRÔNICA: *UM ENSAIO  
CLÍNICO RANDOMIZADO.***

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2017**

Vivianne Carvalho da Cunha Trajano

**GEL DE DOXICICLINA ENCAPSULADA EM  $\beta$ -CICLODEXTRINA  
COMO AGENTE TÓPICO ADJUVANTE PARA O TRATAMENTO  
NÃO CIRÚRGICO DA PERIODONTITE CRÔNICA: *UM ENSAIO  
CLÍNICO RANDOMIZADO.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia - área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortés  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Moreira Lanza

Belo Horizonte  
2017

## AGRADECIMENTOS

À *Energia emanante no **Universo***. Aos meus antepassados. Aos meus amados **pais**. Aos meus **sogros**. Ao meu marido, **Adriano**, amigo e companheiro, muito obrigada por tudo. A cada membro da minha **família**. Gratidão!

Agradeço à **Universidade Federal de Minas Gerais**.

Agradeço à **Faculdade de Odontologia da UFMG**.

À minha orientadora **prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortés Segura**, muito obrigada pelas oportunidades dadas nos 11 anos de pesquisa que tornaram possível chegar até aqui.

À minha co-orientadora **prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Moreira Lanza**, pelas contribuições detalhadas e resolutivas.

Aos professores colaboradores da Faculdade de Odontologia da UFMG, **Luís Otávio Miranda Cota, Fernando de Oliveira Costa e Cláudia Borges Brasileiro**.

Ao **prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra Millan**, muito obrigada aos recursos oferecidos pelo Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais da Química (LEMB). Obrigada **prof. Dr. Ricardo Orlando** do departamento de Química (UFMG).

Aos colegas de laboratório e pesquisa: **Milena, Tarlene, Kellen, Sávio, Karina, Alfonso, Diego, Esdras, Leo**, obrigada. Ao aluno de Iniciação Científica **Jonathas Henriques**.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFMG, na pessoa do **prof. Dra. Isabela Pordeus**. Às secretárias do Colegiado de Pós-Graduação, **Laís e Lucilene**, pelo apoio.

Aos **professores** que participaram da minha formação profissional na graduação, mestrado e doutorado, muito obrigada!

Aos **funcionários** da FO-UFMG.

Aos **pacientes voluntários**, pela confiança depositada.

Ao farmacêutico **Thiago Abílio Lopes Rocha**, pela disponibilidade e pelo preparo dos géis experimentais testados neste trabalho.

Às agências de fomento **CAPES** pela bolsa concedida, **CNPq, FAPEMIG e INCT/NanoBiofar**, pelo apoio financeiro.

Aos colegas dos cursos de mestrado e doutorado. Obrigada **Ana Paula Brasileiro**.

*A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.  
Agradeço pela oportunidade que me deram de trabalhar, aprender e apoio para  
continuar...*

*Muito obrigada.*

***“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo, mas qualquer um pode  
recomeçar e fazer um novo fim.”***

***Chico Xavier***

## RESUMO

**Objetivo:** comparar a eficácia clínica de um gel de doxiciclina 10% encapsulada em  $\beta$ -ciclodextrina (DOX) /  $\beta$ CD), com o gel de 10% DOX - pura, como adjuvantes da Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) em um ensaio clínico. **Materiais e Métodos:** trinta e três indivíduos com diagnóstico de periodontite crônica (PC) foram randomizados para: grupo I (GI) (10% de gel DOX + RAR), grupo II (GII) (10% de gel de DOX /  $\beta$ -CD + RAR) que receberam aplicação dos géis em T0 e T1 e grupo III (GIII), apenas RAR. Os parâmetros clínicos de Profundidade à Sondagem Periodontal (PSP), Nível de Inserção Clínica (NIC), Sangramento à sondagem (SS) e Índice de Placa Visível (IPV) foram avaliados em: tempo inicial (T0), 30 dias (T1) e 60 dias (T2). **Resultados:** Dentro dos grupos, GII apresentou a redução mais significativa nas médias de PSP e SS e o maior ganho médio em NIC ( $p < 0,05$ ). Ao comparar os três grupos, GII apresentou maior redução em PSP (2,62 mm) ( $p < 0,003$ ) e atingiu o maior número de indivíduos com ganho de inserção clínica (2,54 mm) em T2 ( $p < 0,003$ ). O SS e IPV apresentaram uma forte redução em todos os grupos, comparando T2 com T0 ( $p < 0,05$ ). IPV e SS diminuíram  $\geq 5$  vezes e duas vezes, respectivamente em T0 até T1, mas diminuíram de forma semelhante em todos os grupos, sem diferença significativa. Na avaliação comparativa das densidades ósseas obtidas nos exames radiográficos de GI e GII realizados nos momentos T0 (RX inicial), T2 (RX 60 dias após T0) e T Final (RX 18 meses após T0), observou-se aumento da densidade óssea ao longo do tempo em todos os grupos. Houve um aumento maior na densidade óssea até 60 dias (T1). No entanto, o GII mostrou maior aumento na densidade óssea, mas não teve diferença significativa em relação ao tipo de gel aplicado. **Conclusão:** O presente estudo mostrou que a aplicação do gel de DOX a 10% incluída em  $\beta$ -CD associada à RAR apresentou melhora significativa nos parâmetros clínicos periodontais (PSP, NIC e SS) e do IPV, em todos os protocolos analisados, proporcionando benefícios adicionais à RAR sozinha. Nos indivíduos tratados, as bolsas periodontais ficaram mais rasas ao final da investigação. Houve aumento da densidade óssea ao longo do tempo em todos os grupos. No entanto, GII mostrou um aumento estatisticamente significativo na densidade óssea entre os tempos T0 e T2, sem diferença significativa em relação à GI. O gel contendo somente DOX a 10% também apresentou benefícios significativos à RAR, porém menores se comparado ao gel com o composto de inclusão (DOX/  $\beta$ -CD). Estes resultados traduzem-se em um ganho real na saúde periodontal. Portanto, a inclusão da doxiciclina em  $\beta$ -CD, liberada localmente, pode ser um adjuvante quimioterapêutico importante no tratamento da periodontite crônica.

**Palavras-chave:** Doxiciclina.  $\beta$ -ciclodextrina. Géis. Periodontite crônica.

## ABSTRACT

### **Doxycycline gel encapsulated in $\beta$ -cyclodextrin as adjunctive topical agent for the treatment non surgical of chronic periodontitis: a randomized clinical trial.**

**Aim:** to compare the clinical efficacy of 10% doxycycline encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin (DOX)/ $\beta$ CD) in gel with 10% DOX- pure gel along adjuvants with scaling and root planning (SRP) in a clinical trial. **Materials and Methods:** Thirty-three subjects with diagnosis of chronic periodontitis (CP) were randomized into: group I (GI) (10% DOX gel + SRP), group II (GII) (10% DOX /  $\beta$ -CD gel + SRP) that received application of the gels at T0 and T1, and group III (GIII), only SRP. The clinical parameters of Periodontal Probing Depth (PPD), Clinical Attachment Level (CAL), Bleeding on Probing (BOP) and Visible Plaque Index (VPI) were evaluated at baseline (T0), 30 days (T1) and 60 days (T2). **Results:** Within the groups, GII presented the most significant reduction in the mean of PPD and BOP and the highest mean gain in CAL ( $p < 0.05$ ). When comparing the three groups, the GII presented a greater reduction in PPD (2.62 mm) ( $p < 0.003$ ) and reached the greatest number of individuals with a gain of clinical attachment (2.54 mm) at T2 ( $p < 0.003$ ). The BOP and VPI had a strong reduction in all groups, comparing T2 with T0 ( $p < 0.05$ ). The VPI and BOP decreased  $\geq 5$  times and twice, respectively at T0 up to T1 in a similar way for all groups, without significant difference. In the comparative evaluation of the bone density obtained in the radiographic examinations of GI and GII performed at moments T0 (initial RX), T2 (RX 60 days after T0) and T Final (RX 18 months after T0), it was observed increase in bone density over time in all groups. There was a greater increase in bone density up to 60 days (T1). However, GII showed greater increase in bone density, but didn't have a significant difference in relation to the type of gel applied. **Conclusion:** the present study showed that the application of the 10% DOX gel included in  $\beta$ -CD associated with SRP showed a significant improvement in periodontal clinical parameters (PPD, CAL and BOP) and VPI, in all analyzed protocols, providing additional benefits to the SRP alone. In the treated individuals, the periodontal pockets were shallower at the end of the investigation. There was an increase in bone density over time in all groups. However, GII showed a statistically significant increase in bone density between T0 and T2 times, without significant difference in relation to GI. The gel containing only 10% DOX also presented significant benefits to RAR, but smaller when compared to gel with inclusion compound (DOX /  $\beta$ -CD). These results translate to a real gain in periodontal health. Therefore, the inclusion of locally released doxycycline into  $\beta$ -CD may be an important chemotherapeutic adjuvant in the treatment of chronic periodontitis.

**Keywords:** doxycycline,  $\beta$ -cyclodextrin, gels, chronic periodontitis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x controlada.....	39
<b>FIGURA 2</b> - Estrutura química da doxicilina.....	43
<b>FIGURA 3</b> - Estrutura molecular e tridimensional das Ciclodextrinas (CDs) naturais: A, $\alpha$ -CD; B, $\beta$ -CD; e C, $\gamma$ -CD.....	77
<b>FIGURA 4</b> - Estrutura química da $\beta$ -ciclodextrina.....	78
<b>FIGURA 5</b> - Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina.....	79
<b>FIGURA 6</b> - Preparação do composto de inclusão e dos géis.....	101
<b>FIGURA 7</b> - Materiais utilizados nos tratamentos, coleta das amostras e avaliação dos parâmetros clínicos.....	103
<b>FIGURA 8</b> - Radiografia interproximal da região posterior de maxila e mandíbula. Técnica de paralelismo. Área avaliada da densidade radiográfica dos defeitos ósseos. Fonte: Serviço de radiologia da FO-UFMG.....	107
<b>FIGURA 9</b> - Processamento de ROI para cálculo do DF. A) ROI duplicado. B) ROI borrado pelo filtro gaussiano. C) Imagem resultante depois de subtrair a imagem borrada do original e adicionar 128. D) Binária e em seguida, a versão invertida da imagem. E) Imagem congelada. Fonte: Sener, <i>et al.</i> , 2015.....	107
<b>TABELA 1</b> - Composição do gel de 10% Doxiciclina em $\beta$ -CD (razão molar 1: 1)..	101

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

- FIGURE 1** - Boxplot of evaluation of measurements of bone densities obtained from radiographic of the subjects treated, between group, Scaling and Root Planning (SRP) + 10% DOX gel (GI) and SRP + 10% DOX/  $\beta$ -cyclodextrin gel (GII), at T0 (initial RX), T2 (RX 60 days after T0) and T Final (RX 18 months after T0).....126
- TABLE 1** - Epidemiological characteristics of the patients and mean of the initial PPD and CAL in accord with protocol analysis.....119
- TABLE 2** - Comparison of PPD within each group and among groups of 10% DOX gel and scaling and root planning (SRP) (GI), 10% DOX:  $\beta$ -cyclodextrin gel and SRP (GII) and SRP alone (GIII), at different time intervals: T0(Baseline), T1 (30 days), T2 (60 days).....121
- TABLE 3** - Reduction values obtained of periodontal probing depth (PPD) and evaluation by sites and percentage according to PPD categories after treatment with 10% DOX GEL and scaling and root planning (SRP) (GI), 10% DOX: $\beta$ -cyclodextrin GEL and SRP (GII) and SRP alone (GIII), at T0(Baseline), T1 (30 days), T2 (60 days) ( $p < 0.003$ ).....122
- TABLE 4** - Gain values obtained from CAL and evaluation by sites expressed as a percentage according to categories after treatment with 10% DOX gel and scaling and root planning (SRP) (G1), 10% DOX: $\beta$ -cyclodextrin gel and SRP (GII) and SRP alone (GIII) ( $p < 0.003$ ).....123
- TABLE 5** - Bleeding on probing (BOP) positive response of the subjects treated with scaling and root planning (SRP) + 10% DOX GEL (GI), 10% DOX/  $\beta$ -cyclodextrin + SRP GEL (GII) and SRP (GIII), according to values at baseline (T0), 30 days (T1) and 60 days (T2), as well as mean of alterations by sites expressed as percentage.....125

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BDD</b>	Baixa Dose de Doxiciclina
<b>BOP</b>	Bleeding on Probing
<b>BP</b>	Bolsa Periodontal
<b>BP</b>	Bolsa Periodontal
<b>CAL</b>	Clinical Attachment Level
<b>CP</b>	Chronic Periodontitis
<b>DLL</b>	Dispositivos de Liberação Local
<b>DOX</b>	Doxiciclina
<b>DSD</b>	Dose Subantimicrobial ou Subterapêutica de Doxiciclina
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPV</b>	Índice de Placa Visível
<b>LDD</b>	Local Drug Delivery
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MIC</b>	Minimum Inhibitory Concentration
<b>mm, mL, µL</b>	Milímetro, Mililitro, Microlitro
<b>MMP</b>	Metaloproteinase
<b>NIC</b>	Nível de Inserção Clínica
<b>PPD</b>	Periodontal Probing Depth
<b>PSP</b>	Profundidade à Sondagem Periodontal
<b>RAR</b>	Raspagem e Alisamento Radicular
<b>SLFs</b>	Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos
<b>SRP</b>	Scaling and Root Planning
<b>SS</b>	Sangramento à Sondagem
<b>TC</b>	Tetraciclina
<b>VPI</b>	Visible Plaque Index
<b>βCD</b>	Beta-Ciclodextrina

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
α	Alfa
β	Beta

## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>96</b>
<b>3 METODOLOGIA EXPANDIDA.....</b>	<b>97</b>
3.1 Desenho do estudo.....	97
3.2 Cálculo amostral.....	99
3.3 Mascaramento e tempo da pesquisa.....	99
3.4 Preparação do composto de inclusão e dos géis.....	100
3.5 Avaliação dos parâmetros clínicos e tratamento periodontais.....	102
3.6 Aplicação dos géis.....	103
3.7 Avaliação radiográfica.....	104
3.8 Análise estatística dos dados.....	108
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO:</b>	
<i>DOXYCYCLINE ENCAPSULATED IN <math>\beta</math>-CYCLODEXTRIN ON THE PERIODONTITIS: CLINICAL TRIAL</i>	
<i>ABSTRACT.....</i>	<i>111</i>
<i>INTRODUCTION.....</i>	<i>112</i>
<i>MATERIALS AND METHODS.....</i>	<i>114</i>
<i>RESULTS.....</i>	<i>118</i>
<i>DISCUSSION.....</i>	<i>127</i>
<i>CONCLUSION.....</i>	<i>130</i>
<i>REFERENCES.....</i>	<i>131</i>

<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	136
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	139
<b>ANEXOS</b> .....	163
ANEXO 1 Termo de consentimento Livre e Esclarecido.....	163
ANEXO 2. Ficha de coleta de dados.....	164
ANEXO 3. Fluxograma explicativo do desenho do estudo.....	165
ANEXO 4. Artigos publicados.....	166
<b>APÊNDICES</b> .....	167
APÊNDICE 1- Aprovação no Comitê de Ética.....	167
APÊNDICE 2 - Periodontograma FO-UFMG.....	168
APÊNDICE 3 – Avaliação do Índice de Placa FO-UFMG.....	169
APÊNDICE 4 – Patente dos géis.....	170
APÊNDICE 5 - <i>two - way</i> ANOVA	173
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	174
<b>7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO</b> .....	176

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### REVISÃO DA LITERATURA

#### 1.1 Periodontite e sistema de liberação controlada de antimicrobianos

A saúde bucal é muito importante para a manutenção da saúde sistêmica do organismo humano. No entanto, várias doenças acometem a boca como neoplasias, disfunções glandulares, cárie dentária e periodontite. O termo “periodontite” é definido como *infecção e destruição dos tecidos periodontais de suporte (ligamento periodontal, cimento, osso alveolar) decorrente, principalmente, do acúmulo do biofilme bacteriano e pode resultar na perda progressiva de inserção conjuntiva e do osso alveolar, levando à formação da bolsa periodontal e a perda do dente (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999).*

A periodontite é uma doença pandêmica, infecciosa, inflamatória, polimicrobiana e multifatorial. É uma doença inflamatória causada pelo acúmulo de bactérias nas superfícies dos dentes sob a forma de biofilmes. Apresenta uma etiologia polimicrobiana e um ecossistema microbiano complexo. É causada por bactérias específicas, chamadas periodontopatógenos, responsáveis pelo aparecimento da doença em indivíduos suscetíveis aos fatores de risco (infecção oportunista) (GRIFFEN *et al.*, 2011).

A bolsa periodontal (BP) pode ser definida como o espaço gerado pelo aprofundamento patológico do sulco gengival entre a gengiva e o dente, devido à degeneração do ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar. Ocorre a migração do epitélio juncional ao longo da superfície do dente, que causa retração da gengiva marginal e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento de bactérias anaeróbias e para o acúmulo de componentes microbianos do biofilme oral e do cálculo, associados à periodontite. Se não for tratada, leva à perda de elementos dentários (JOSHI *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2014).

A prevalência da periodontite é maior que o câncer, doenças cardíacas, artrite, obesidade e AIDS. No entanto, apesar da prevalência da doença, esta permanece subtratada. O fator etiológico primário da periodontite é o acúmulo do biofilme dental no sulco gengival, que induz à infecção do periodonto por meio de

mecanismos diretos, causando destruição tecidual pela liberação de enzimas líticas e produtos citotóxicos bacterianos, e indiretos, desencadeando as reações de defesa do hospedeiro que podem resultar na perda progressiva dos tecidos periodontais de suporte levando à formação da bolsa periodontal, a perda de dentes e a significativos custos de tratamento. O hospedeiro representa um papel importante na patogenia da periodontite a partir da produção de enzimas e outros mediadores endógenos da resposta inflamatória, responsáveis por grande parte do dano tecidual observada em parâmetros clínicos e histopatológicos (LEON *et al.*, 2016; KORNMAN, 2014; KRAYER *et al.*, 2009; SCANNAPIECO *et al.*, 2010).

A periodontite é polimicrobiana e associada a fatores locais e sistêmicos, apresenta manifestação, gravidade e progressão que diferem entre os indivíduos. Esta patologia apresenta um papel etiológico ou modulador em várias doenças sistêmicas e fatores de risco estão bem estabelecidos e associados à periodontite tais como: tabaco, diabetes mellitus, estresse psicológico, susceptibilidade genética, resposta imune do hospedeiro, osteoporose, envelhecimento, associações respiratórias, cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doenças respiratórias, desfecho adverso da gravidez e pode ser a causa de baixo peso ao nascer (GUIGLIA *et al.*, 2013; KAUR *et al.*, 2014; VENNILA *et al.*, 2016).

Dasanayake *et al.* (2001) associaram o nascimento de bebês prematuros de baixo peso com o perfil de higiene oral da mãe. Eles relataram que os níveis de prostaglandina E2 (PGE2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) são produzidos durante a infecção periodontal e aumentam lentamente durante a gravidez e se cruzarem a barreira placentária podem induzir o trabalho de parto levando ao parto prematuro. A *Porphyromonas gingivalis* (Pg) também pode estar envolvida na patogênese de doenças crônicas autoimunes, como a Esclerose Múltipla (EM), pois a bactéria é capaz de estimular células gliais a secretarem mediadores inflamatórios. Estudo com animais indicam que portadores da EM infectados com Pg têm a doença agravada (SHAPIRA *et al.*, 2002).

Uma serie de outros fatores, denominados secundários, determinam a instalação, a progressão e o quadro clínico da doença. Exercem influência negativa sobre os tecidos e as reações de defesa do hospedeiro, aumentando a suscetibilidade à doença. Os fatores de risco secundários podem ser classificados

em alteráveis e não alteráveis. Os fatores de risco inalteráveis são anomalias genéticas e etnia, com maior prevalência em negros, sexo, com maior prevalência em homens e idade. Os fatores de risco alteráveis podem ser sistêmicos ou locais. Os locais são (MACHION *et al.*, 2004):

1- Composição e qualidade da saliva: a saliva forma um filme protetor sobre a mucosa e tem capacidade de limpeza que varia conforme o seu fluxo e viscosidade. A quantidade de bicarbonato, fosfato, cálcio e fluoreto determina sua capacidade de tamponamento e de remineralização. A atividade antimicrobiana da saliva é definida pelas imunoglobulinas secretadas, lisozima, catalase, lactoperoxidase e outras enzimas.

2- Respiração bucal: resseca a mucosa e elimina a ação protetora da saliva.

3- Irritações exógenas: mecânicas, químicas, térmicas, corrosivas, e actínicas.

4- Reações alérgicas.

5- Funcionais: trauma oclusal.

6- Bruxismo.

A periodontite é classificada em periodontite crônica e agressiva. Dependendo da extensão da perda óssea, é classificada em localizada ou generalizada (>30 sítios envolvidos) e dependendo da perda de inserção, é classificada em leve, moderada e grave (AAP, 1999). A periodontite crônica (PC) é a doença periodontal mais comum, sendo comum em adultos, é uma doença inflamatória que leva à destruição do tecido conjuntivo e à perda do osso de suporte adjacente e pode levar a tratamento de custo significativo e a perda dos dentes. Ela é o resultado de uma microbiota complexa e apresenta etiologia complexa dependente da comunidade bacteriana que reside no sulco gengival. O início e a progressão da PC são uma consequência da interação entre bactérias orais e as respostas imunes do hospedeiro. As bactérias podem ser diretamente patogênicas ou podem causar

danos de forma indireta por estimular respostas inflamatórias do hospedeiro (JOSHI *et al.*, 2016; SCANNAPIECO *et al.*, 2010).

Os microorganismos e seus produtos atuam direta ou indiretamente como os principais fatores na patogênese da periodontite. Alguns desses componentes e produtos, como enzimas histolíticas participam do desenvolvimento da doença atuando diretamente na estrutura do periodonto. As bactérias se mantendo em contato íntimo com o tecido gengival inflamado, representam fonte abundante e permanente de material antigênico potente que pode induzir a formação de anticorpos nos nodos linfáticos regionais, assim como no local, os quais interagindo com antígenos bacterianos ativam o sistema complemento liberando substâncias biologicamente ativas na permeabilidade capilar, na contração da musculatura lisa, e na atração de neutrófilos polimorfonucleares (LINDHE, 2010). Além disso, citocinas são liberadas pelas células do epitélio gengival, macrófagos e diversas outras células como os monócitos, fibroblastos e linfócitos. A interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6), interleucina 8 (IL8) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) são as principais citocinas que participam da resposta imunoinflamatória (PETURSSON *et al.*, 1994).

O biofilme bucal é o mais complexo do organismo e apresenta propriedades dinâmicas intrínsecas moduladas por fatores ambientais e biológicos, como a dieta e o sistema imune do hospedeiro. O microbioma bucal consiste em mais de 1000 espécies de bactérias (embora nem todas sejam patogênicas e algumas permanecem transitoriamente), sendo em sua maioria, anaeróbias estritas ou facultativas. Muitas dessas espécies vivem em simbiose com o hospedeiro saudável. A quebra dessa homeostasia pode ocasionar a periodontite. Um número limitado de bactérias orais contribui diretamente para a doença (GRIFFEN *et al.*, 2012). A contagem microbiana do sulco gengival pode variar de  $10^3$  em um sulco saudável a  $10^8$  em um sulco na BP (VENNILA *et al.*, 2016).

Microorganismos específicos ou grupos de espécies são reconhecidos periodontopatógenos subgingivais: *Aa* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *Pg*, *Tannerella forsythia* (*Tf*) e *Treponema denticola* (*Td*) ocorrem com maior frequência e / ou em níveis e proporções mais elevados nos locais e indivíduos com periodontite. A *Pg* e *Aa* são considerados os principais patógenos periodontais

responsáveis pela destruição periodontal. De acordo com MORILLO *et al.* (2004) *Pg* foi predominante entre todos os patógenos. Outros microrganismos, como os membros do gênero *Actinomyces*, estão principalmente associados com a saúde periodontal (NICKLES *et al.*, 2017). Enquanto, a *Pi*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum (Fn)*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga*, são espécies consideradas associadas à periodontite. As bactérias *Aa*, *Fusobacterium nucleatum*, *Pg* e *Prevotella intermedia (Pi)* são atualmente consideradas altamente associadas à PC. A PC é mais prevalente nos sítios expostos a esses agentes patogênicos. Ao todo 123 espécies foram significativamente identificadas na doença e 53 na saúde. *Espiroquetas*, *Synergistetes* e *Bacteroides* foram mais abundantes na doença, enquanto que as Proteobactérias foram encontradas em níveis mais elevados em controles saudáveis. Dentro do filo *Firmicutes*, a classe *Bacilli* foi associada à saúde, enquanto a *Clostridia*, *Negativicutes* e *Erysipelotrichia* foram associadas à doença. (GRIFFEN *et al.*, 2011). A associação das espécies anaeróbicas Gram-negativas com a patogenicidade da doença já foi bem documentada. Como estas bactérias são indígenas ou autóctone da microbiota bucal, a sua eliminação é difícil, e a probabilidade de recolonização das bolsas periodontais e a recorrência de infecções posteriores é alta (PRIYANKA *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que *Fn* foi um dos anaeróbios Gram-negativos mais abundantes na placa supragingival madura e subgingival de indivíduos saudáveis e com periodontite. A *Aa* apresentou a menor prevalência entre as quatro bactérias selecionadas. Isso pode ser devido ao fato de *Aa* estar mais associada à periodontite agressiva que à PC (TUTER *et al.*, 2010). A *Aa* é associada à etiologia dos casos mais graves (NICKLES *et al.*, 2017). A alta prevalência detectada para *Pg* (95,31%) concorda com resultados anteriores que sugeriram que a *Pg* está associada à progressão da doença e a proporção dessa espécie aumenta em bolsas profundas. Socransky *et al.* (1991) verificaram maior frequência de *Pg*, *Pi* e *Tf* em bolsas periodontais profundas e verificaram ainda que a frequência de *Pg*, *Pi* e *Aa sorotipo b* foi maior conforme o aumento da PS. Cortelli *et al.* (2011) observaram que *Fn*, *Pg* e *Pi* tiveram elevada presença em asiáticos com PC e a *Pi* foi a mais prevalente em estudo brasileiro. A sensibilidade da *Pi* também pode ser usada como

um parâmetro importante para avaliar a eficácia de uma nova terapia (DENG *et al.*, 2017).

Inicialmente, foi aceita a relação direta entre o número total de bactérias e a amplitude do efeito patogênico, porém não eram consideradas as diferenças biológicas na composição do biofilme (hipótese da placa inespecífica) (THEILADE, 1986). Posteriormente, estudos longitudinais como de Slots (1976) e Newman *et al.*, (1977) indicaram maior risco de destruição periodontal nos sítios colonizados por algumas espécies de microorganismos potencialmente patogênicos, evidenciando a especificidade dos biofilmes bacterianos, atualmente aceita (hipótese da placa específica) (LÖESCHE, 1979). Apesar de evidências indicarem a especificidade bacteriana da periodontite e de fatores associados às periodontopatias como a influência genética (WALKER *et al.*, 2004), a resposta imune do hospedeiro (SLOTS e JORGENSEN, 2002) e fatores ambientais (ROBERTS, 2002), a terapia periodontal ainda se baseia, predominantemente, na redução da microbiota supra e subgingival à quantidade compatível com a saúde dos tecidos e a suspensão da doença. O principal objetivo da terapia periodontal padrão é a alteração dos biofilmes subgingivais (IOANNOU *et al.*, 2010).

*Griffen et al. (2012) acompanhando a periodontite observaram, através do índice de Shannon, maior diversidade no número de espécies, na associação e na uniformidade na periodontite durante a progressão da doença. As espécies associadas à saúde representaram uma fração menor da comunidade total. Do ponto de vista bacteriano, esta comunidade mais diversificada representa um ecossistema mais estável. Essa diversidade pode ter resultado das defesas do hospedeiro que limitariam a composição da comunidade às comensais não-patogênicas. Enquanto que, a composição da comunidade bacteriana de cáries torna-se menos diversa durante a progressão da doença (GROSS et al., 2010).*

As bactérias periodontopatogênicas residem em biofilmes existentes nos dentes ou em superfícies epiteliais. A formação do biofilme ocorre em etapas. Uma vez estabelecida no biofilme, a bactéria pode apresentar uma expressão organizada de um conjunto de genes e características fenotípicas distintas da forma planctônica (estado livre). Tais biofilmes conferem proteção parcial aos microrganismos colonizadores, através de propriedades metabólicas, contra as defesas do

hospedeiro, bem como dos antimicrobianos utilizados para o tratamento, que não seriam possíveis se as espécies existissem em estado livre (planctônico) e aumentam a resistência das bactérias presentes no biofilme a antimicrobianos (HAFFAJEE *et al.*, 2003).

Socrasky *et al.* (1998) delinearam um conjunto de três espécies que apresentam associações fortes com a periodontite e entre si: Pg, Td e Tf. e descreveram seis complexos microbianos no biofilme subgengival de indivíduos adultos. O complexo amarelo, azul, verde e violeta (ou roxo) constituem a base da pirâmide do biofilme: são os colonizadores iniciais da superfície dental e não se relacionam com a doença periodontal sendo muitos deles considerados benéficos. O complexo amarelo constituído por membros do gênero *Streptococcus*; o complexo verde constituído pela espécie *Capnocytophaga*, sorotipo A do Aa, *E. corrodens* e *Campylobacter concisus*; o complexo roxo constituído por *V. parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. Os quatro primeiros complexos basais são antigos colonizadores das superfícies dentárias, fornecem receptores e criam condições ecológicas para o crescimento dos complexos laranja e vermelho, predominantemente Gram-negativos. O complexo laranja é constituído por: *Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, subespécie de *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *S. constellatus*. O complexo laranja está implicado com a patogênese das doenças periodontais, precede e cria condições para a implantação do complexo vermelho, formado pelas espécies: *B. forsythus*, *Pg*, *Td* e *Tf*, consideradas agentes etiológicos da PC. Esses dois últimos compreendem os principais agentes etiológicos das doenças periodontais, estão relacionados com o aumento da PS e com a presença de SS. São consideradas as bactérias marcadoras da periodontite: Aa e o complexo vermelho (SOCRANSKY *et al.*, 1998; LINDHE, 2010).

Uma classificação da microbiota subgengival em complexos microbianos favoreceu o conhecimento das inter-relações entre as espécies subgengivais, mostrando um aumento de bactérias dos complexos Laranja e Vermelho em indivíduos portadores de periodontite, tornando-se uma ferramenta auxiliar na orientação da terapia periodontal (SOCRANSKY *et al.*, 1998). *Vários estudos confirmam a relação entre o complexo Vermelho e a PC. Embora associado a outras formas de periodontite, Aa parece atuar de forma isolada quando comparado aos*

patógenos periodontais propriamente ditos (Td, Tf e Pg) ou aqueles com nível intermediário de evidência Pi, *Campylobacter rectus* (*C. rectus*), *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*), *Parvimonas micra* (anteriormente *Peptostreptococcus micros*), *Eubacterium nodatum* (*E. nodatum*), *Fusobacterium nucleatum vincentii* (*F. nuc. Vincentii*) (RASLAN et al., 2011)

A presença da bactéria é fundamental para a patogênese da periodontite, mas não é suficiente para o início dela. A Pg, Tf e Td, pertencentes ao complexo vermelho (SOCRANSKY et al., 1998), juntas ou separadamente aumentam o risco para a progressão da periodontite. Takeuchi et al. (2001) revelam que a presença concomitante dessas espécies e sua co-agregação demonstram a relação simbiótica entre elas.

Aquisição de periodontopatógenos é pré-requisito para o desenvolvimento da periodontite, entretanto a transferência de microrganismos periodontopatógenos não resulta, necessariamente, em colonização ou infecção que causa a destruição do periodonto no hospedeiro. Após a colonização, a capacidade patogênica dos microrganismos infectantes, a competição entre bactérias, bem como as interações entre estas e o hospedeiro, determinarão se os microrganismos serão eliminados, permanecerão em níveis não patogênicos, ou proliferarão e provocarão lesões inflamatórias. Indivíduos que abrigam periodontopatógenos, ainda que não manifestem periodontite, podem ser fonte de transmissão (KRAYER et al., 2010). Os patógenos podem ser transmitidos entre os membros da família (transmissão vertical), especialmente do patógeno chave Aa (NICKLES et al., 2017). Técnicas de genética molecular têm demonstrado que se uma criança é colonizada por uma espécie potencialmente patogênica, então um dos pais comumente abriga a bactéria idêntica genotipicamente. Ocorre também transmissão de bactéria entre cônjuges e entre irmãos (transmissão horizontal) (KRAYER et al., 2010).

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* são considerados patógenos periodontais exógenos importantes. São considerados exógenos por que: a detecção destes microrganismos é associada à doença; não são detectados freqüentemente em indivíduos com periodonto sadio; comumente provocam resposta humoral e o tratamento resulta na eliminação destes da cavidade bucal. O Aa é capaz de persistir no hábitat bucal de indivíduos com periodonto

saudável por pelo menos 12 meses após a eliminação deste patógeno. Portanto, o conhecimento das vias de transmissão é fundamental e deve ser considerado na prevenção e tratamento da periodontite, uma vez que há maior possibilidade de infecção, reinfecção e recolonização em pacientes suscetíveis (KRAYER *et al.*, 2010).

A visão histórica das comunidades subgingivais associadas à periodontite é que elas são predominantemente negativas para o Gram, e as comunidades associadas à saúde são Gram positivas. No entanto, sugeriu-se que os artefatos da coloração podem explicar a avaliação anterior (WADE, 2011). Um Gram positivo, *Filifactor alocis*, é potencialmente importante na doença, mas todas as comunidades são misturadas em relação à reação de coloração de Gram. O pequeno aumento na proporção de Gram negativo na doença, em comparação a saúde, é explicado pela diminuição nas proporções de duas espécies de estreptococos associadas à saúde (GRIFFEN *et al.*, 2012).

Os resultados de Griffen *et al.* (2012) sugerem que estão ocorrendo mudanças no perfil funcional da comunidade e confirmam a associação de espécies específicas que estão presentes apenas na doença como a *Pg*, *T. denticola* e *Tf* e explicam melhor a patogênese da doença (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Seqüenciamentos recentes estimaram um número muito maior de espécies e de espécies não caracterizadas (PUSHALKAR *et al.*, 2011). A *Filifactor alocis* parece tão prevalente e fortemente associada à doença, assim como, Espiroquetas e uma série de espécies não tão estudadas. Algumas das espécies associadas à doença estão presentes em indivíduos saudáveis e ao aumento da doença (GRIFFEN *et al.*, 2012).

Um problema fundamental da pesquisa epidemiológica está no estabelecimento da causalidade. Uma possível explicação para a presença de muitas espécies associadas à doença é que as bolsas profundas, com menores concentrações de oxigênio, formam habitats que permitem que espécies adicionais encontrem novos nichos. Organismos associados à doença também são encontrados em bolsas rasas e podem representar um estágio intermediário no desenvolvimento da doença. Neste caso, a presença de bactérias patogênicas,

ainda que assintomático, poderia ser prognóstico para a doença futura (GRIFFEN *et al.*, 2012).

A *Porphyromonas gingivalis* é o mais bem estabelecido patógeno associado à Pg é um anaeróbio pigmentado preto gram-negativo pertencente ao complexo vermelho (SOCRANSKY *et al.*, 1998), que coloniza o sulco subgingival. É um colonizador tardio ou secundário do biofilme bucal e adere preferencialmente aos *Streptococcus gordonii*, um colonizador inicial. Ela está associada à progressão da periodontite e sua redução está associada à saúde periodontal. Os sítios que abrigam esta espécie podem ser importantes para o restabelecimento da saúde periodontal (PRIYANKA *et al.*, 2015).

A Pg pode penetrar na corrente sangüínea através de atos simples, como mastigar, falar, e principalmente durante a escovação, levando à bacteremia transitória. Esses periodontopatógenos presentes na corrente sangüínea são capazes de invadir células endoteliais ou induzir agregação plaquetária, considerada um dos marcadores para a formação do ateroma da doença cardiovascular (KURAMITSU *et al.*, 2003). Foi demonstrado que quanto maior a concentração no plasma da Proteína C-reativa (PCR), um marcador para inflamação sistêmica, mais alta a incidência de infarto do miocárdio ou infarto isquêmico. Como nas doenças periodontais o processo inflamatório é intenso, os patógenos periodontais podem estar envolvidos no aumento da PCR como fonte de inflamação crônica. De fato, a presença de patógenos periodontais Pg, Pi, C. rectus e Tf em amostras subgingivais é associada ao aumento dos níveis séricos de PCR (NOACK *et al.*, 2001), de fibrinogênio e de células brancas. Pacientes periodontais possuem um risco 9,5 vezes maior de desenvolver doenças coronarianas, independente de outros fatores de risco, do que pacientes com periodonto saudável (ABOU-RAYA *et al.*, 2002).

A Pg possui inúmeros fatores de virulência que facilitam a adesão e invasão das células do periodonto, degradação da matriz extracelular, modulação das respostas imuno-inflamatórias do hospedeiro e a resposta do hospedeiro aos patógenos contribuem para a indução da periodontite e podem contribuir para a progressão e severidade da doença, levando à destruição periodontal. Os Fatores de virulência são: toxinas de células, enzimas, inibidores de citocinas, pili para

fixação, etc, intrínsecos a certas espécies. As fímbrias medeiam a adesão da Pg às células epiteliais, fibroblastos e colonizadores iniciais do biofilme dental e também induzem a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (LAMONT *et al.*, 2002). A leucotoxina é um dos principais fatores de virulência devido a sua capacidade de inativar a função das células do sistema imunológico humano, como neutrófilos e macrófagos. Entretanto, fatores ambientais locais, como os níveis de ferro e pH, podem influenciar a produção de leucotoxina (FIVES-TAYLOR *et al.*, 1996)

Na periodontite crônica, a Aa pode estar presente entre 30% e 50% de pacientes. Esta espécie bacteriana possui muitos fatores de virulência envolvidos nos processos de perda osso alveolar e destruição do tecido conjuntivo. Embora, a Aa seja considerado principalmente como um agente patogênico oral, pode ser detectado na circulação sistêmica (OSCARSSON *et al.*, 2008). Os níveis de Aa correlacionam-se com uma resposta inflamatória excessiva do hospedeiro em indivíduos susceptíveis, caracterizados por concentrações aumentadas dos níveis de citocinas pró-inflamatórias ou de anti-inflamatórias reduzidas como a interleucina (IL) -10 (CASARIN *et al.*, 2010).

A bactéria tem a capacidade de reprimir o sistema imune, principalmente nos estágios iniciais da infecção para facilitar sua multiplicação e combater os componentes do sistema imune nato e inato. O lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da Pg também representa um mecanismo de virulência por ser capaz de ativar células do sistema complemento, e também ativar diferentes tipos celulares (fibroblastos, monócitos/ macrófagos) a liberar citocinas inflamatórias (LAMONT *et al.*, 2002). Nakao *et al.* (2006) afirmaram que a síntese do antígeno-O LPS, promove a exposição de receptores de membrana envolvidos na adesão às superfícies sólidas e em outros microrganismos e que o mesmo gene responsável pela síntese do antígeno-O está envolvido no aumento da formação de biofilme. Em estudo de Lin *et al.* (2006) os autores concluíram que a fímbria maior da Pg está envolvida na adesão e início da colonização, enquanto a menor está envolvida na formação de microcolônias e maturação do biofilme.

A aquisição de nutrientes é fundamental para a sobrevivência da bactéria, é realizada por proteases que degradam componentes dos tecidos do hospedeiro,

como colágeno, fibronectina, queratina etc, podendo contribuir para a perda de inserção, além de facilitar a invasão do tecido epitelial e conjuntivo. Essas proteases podem modular a resposta do sistema imune do hospedeiro, induzindo ou reprimindo. Essa dualidade por um lado leva à atração de PMNs e interleucinas (ILs) ao sítio infectado, posteriormente esses PMNs são lisados e suas enzimas líticas degradam o próprio tecido hospedeiro, fornecendo nutrientes para a bactéria, mas danificando os tecidos de suporte (KATZ *et al.*, 2002).

A necessidade de hemina para o metabolismo de Pg é um fator limitante para o seu crescimento e também contribui para a regulação dos fatores de virulência (GENCO *et al.*, 1995). Muitos componentes do hospedeiro, como hemoglobina, albumina, entre outros, contém hemina e a bactéria é capaz de degradá-las para conseguir hemina. Acredita-se que em sítios periodontais inflamados com sangramento gengival, a concentração de hemina é elevada e isto pode ser um fator predisponente para o acúmulo de Pg nesses sítios. Sabe-se que a fibrina e o fibrinogênio são fatores essenciais para a formação do coágulo sangüíneo (LAMONT *et al.*, 2002). Gingipaínas K e R da Pg são fatores fibrinogenolíticos e contribuem para o aumento do tempo de sangramento, o quê demonstra a relação das proteases e da Pg com a tendência ao sangramento em sítios periodontais inflamados (IMAMURA *et al.*, 1995).

A *P. gingivalis* pode interagir com vários tipos de células periodontais. É também capaz de invadir a célula do hospedeiro, persistir nas células epiteliais gengivais e fibroblastos, e migrar para os tecidos periodontais mais profundos, quer por espalhar-se entre as células ou pela transmissão direta célula-a-célula. Em osteoblastos, a Pg reduz a expressão da ciclina D / E e após interações de longo prazo e/ou tratamento de curto prazo inibi a proliferação e a diferenciação de OBs após 24 horas da infecção (KATO *et al.*, 2008). Diferenciação de OBs prejudicada contribui para diminuir a mineralização, conseqüentemente, contribui para a perda de osso alveolar na PC. A perda de osso alveolar é vantajosa para abrigar o anaeróbio, à medida que aumenta a profundidade da bolsa periodontal e cria um nicho maior (ZHANG *et al.*, 2010). Produtos metabólicos da Pg inibem a osteogênese, demonstrado pela diminuição da síntese da matriz extracelular e do acúmulo de cálcio e de  $P_i$ . Também induz a produção de citocinas inflamatórias em

OBs e indiretamente estimulam a reabsorção óssea (OKAHASHI *et al.*, 2008). As respostas celulares hospedeiras são mais complexas do que aquelas induzidas pelos componentes bacterianos. A Pg interage com OBs por um período de tempo prolongado devido à natureza crônica da periodontite.<sup>2</sup> Múltiplas bactérias foram visualizadas co-existindo num único OB. Ela invade OBs numa forma dose-tempo-dependente, aumenta a percentagem de OBs com Pg internalizadas e inibe a diferenciação e a maturação dos OBs infectados e a osteogênese, em parte, através da inibição da transcrição dos fatores regulatórios da diferenciação Cbfa-1 e Osterix (ZHANG *et al.*, 2010).

O biofilme dental é uma estrutura organizada, porém não uniforme que varia de acordo com a localização do dente na arcada e sobre a mesma unidade varia de acordo com o local para a qual a face está voltada. Os molares apresentam maior risco, enquanto que pré-molares e incisivos são menos propensos, e o caninos são os mais resistentes. O seu estágio de formação é um dos fatores de maior importância nos aspectos ecológicos e do potencial patogênico. Essa diferença é tanto estrutural quanto na composição bacteriana. O biofilme dental passa por uma progressão de organismos sendo os estreptococos os pioneiros seguidos pelo aparecimento de actinomicetes e ocasionalmente se convertendo para um biofilme maduro onde a prevalência é de Gram-negativos anaeróbios (ROSAN *et al.*, 2000).

A evolução da periodontite não tratada pode durar anos fazendo gatilhos de bacteremias várias vezes ao dia, passa por um surto de agudização, quando entra em processo de destruição tecidual, voltando à fase de quiescência, prosseguindo em alternância entre as fases de latência e destruição. Esse processo sem tratamento ocorre de forma rápida ou em longos intervalos até a perda total do suporte ósseo e a perda do elemento dentário. A evolução da periodontite apresenta grande variabilidade entre os indivíduos. Ela depende de fatores locais, como quantidade e composição do biofilme bacteriano e da susceptibilidade do hospedeiro, determinada pelo seu estado de saúde, imunidade, fumo, estresse, entre outros fatores. Assim, ela pode se instalar nas mais diversas idades e apresentar evolução bastante variável (WOLF *et al.*, 2006). No período de apenas um mês de evolução da periodontite, durante a mastigação e a escovação, ocorre

exposição aos patógenos e aos seus produtos, sendo mil vezes maior do que em uma extração dentária (LINDHE, 2010).

Uma das características mais importantes do biofilme oral de humanos é a capacidade de co-agregação a outras bactérias. Co-agregação pode ser definida como um reconhecimento célula - célula específico entre tipos celulares diferentes, podendo ser intra, inter ou multigenérico. Em muitas dessas associações a interação é específica, assim como podem ser os componentes envolvidos. A *Pg* adere a diferentes microrganismos através de diferentes mecanismos. Com *F. nucleatum* ocorre através de proteína adesina ao receptor carboidrato específico no *Pg*, possibilitando a colonização de sítios supra e sub-gengivais pelas espécies (KOLENBRANDER *et al.*, 2006).

Um dos mais importantes mecanismos de colonização oral por *Pg* ocorre através da co-agregação ao *Streptococcus gordonii*, um colonizador inicial do biofilme dental. *Pg* adere à camada de *S. gordonii* previamente aderida às superfícies sólidas, formando estruturas em forma de torres. Em 1978, Slots e Gibbons, em estudo realizado in vivo, verificaram que *Bacteroides melaninogenicus subsp. asaccharolyticus* (atualmente *P. gingivalis*) coloniza ambientes previamente colonizados por Gram positivos como estreptococos e actinomices, denominados colonizadores primários do biofilme dental. A presença dos colonizadores primários é de fundamental importância, pois após sua adesão à superfície dos dentes eles fornecem substratos para colonizadores subsequentes, influenciando os estágios de sucessão bacteriana (LI *et al.*, 2004).

Marsh (2005) ressalta que bactérias do biofilme interagem com os vizinhos, funcionando como uma entidade coordenada, espacialmente organizada e metabolicamente integrada. Segundo Stoodley *et al.* (2002), as adaptações estruturais e inter-relações dos organismos dentro dos biofilmes e conseqüentemente a sua sobrevivência são possíveis graças à expressão de um conjunto de genes que resultam em fenótipo diferente daqueles em estado planctônico. A transferência horizontal de genes pode ocorrer rapidamente nos biofilmes, possibilitando a emergência de novos patógenos, através da aquisição de genes de resistência a antibióticos, fatores de virulência e capacidades de sobrevivência no ambiente. Mesmo dentro da própria espécie, pode haver pouca ou

nenhuma recombinação entre diferentes clones da Aa 6. Isso ocorre quando se considera os sete sorotipos (a-g) de Aa (LPS) ou dois padrões leucotóxicos. Embora dotada de vários fatores de virulência, a patogenicidade decorre de uma complexa interação parasita-hospedeiro. Nem todas as cepas de Aa são igualmente patogênicas e outras contribuem para o resultado final da interação. Aa secreta uma molécula sinalizadora capaz de mediar as respostas interespecies, envolvendo patógenos: Pg, Pi e Fn (CORTELLI, et al., 2011)

As interrelações bacterianas, como sinergismo, comensalismo ou antagonismo, desempenham papéis importantes no desenvolvimento e na manutenção dos membros da comunidade do biofilme dental (KURAMITSU *et al.*, 2007). Estas podem ainda modificar o potencial patogênico de algumas espécies e, em consequência, modificar a própria expressão da doença. Sabe-se que algumas bactérias do Complexo Laranja contribuem para um pH mais neutro no biofilme dental, favorecendo o desenvolvimento de bactérias do Complexo Vermelho e contribuindo para o agravamento e a progressão da doença (FONG *et al.*, 2001).

Os biofilmes se desenvolvem de forma tridimensional, como edifícios, mas uma bactéria pode se destacar e voltar ao estilo de vida livre (planctônica) evolui para uma bactéria aderida, ocorre a formação de microcolônias e um biofilme estabelecido, até um membro se destacar do biofilme à procura de outro ambiente mais favorável para se estabelecer. Existe uma relação direta e dinâmica entre o ambiente e a diversidade e a abundância das espécies. Em resposta à inflamação gengival ocorre um aumento do fluido gengival, elavando a quantidade local de mediadores inflamatórios e nutrientes ricos em proteínas. Isso favorece o crescimento de microrganismos com metabolismo assacarolítico e redução do potencial redox (WATNICK e KOLTER, 2000).

Os tratamentos periodontais têm sido variados e numerosos, é inespecífico e constitui-se em meios mecânicos e químicos. O controle mecânico do biofilme supragengival é realizado pelo indivíduo através do uso do fio dental e escova dentária. O controle mecânico do biofilme subgengival e do cálculo pode ser cirúrgico e não cirúrgico e são realizados pelo dentista. O objetivo da terapia periodontal é prevenir, reduzir a infecção em bolsas rasas e de média profundidade controlar ou eliminar a periodontite e restaurar a forma perdida, a função, a estética

e o conforto (DRISKO *et al.*, 2014). O desbridamento mecânico de Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) é um tratamento não cirúrgico e considerado padrão ouro, sendo um pré-requisito para o controle de infecções periodontais. A terapia periodontal padrão tem como objetivo reduzir a carga bacteriana total e alterar as condições ambientais dos nichos microbianas. Ele perturba a flora subgengival e proporciona superfícies radiculares limpas, lisas, e biologicamente compatíveis. Na maioria dos casos, suficiente para que o paciente possa manter o cuidado em casa e restaurar a saúde periodontal. Está bem documentado que a terapia mecânica combinada à instrução de higiene bucal é eficaz para alcançar esse objetivo. Os meios químicos incluem a administração de fármacos por via sistêmica e/ou local por meio da irrigação subgengival e de bochechos com enxaguatórios bucais (TARIQ *et al.*, 2012, SANZ *et al.*, 2012) Assim, a terapia periodontal prioriza interromper a reação inflamatória, promover a erradicação dos patógenos subgingivais e eliminação da bolsa periodontal (JAIN *et al.*, 2008, GRIFFEN *et al.*, 2012, ISMAIL *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2010; VENNILA *et al.*, 2016 ).

A RAR pode remover diretamente o biofilme na superfície da raiz, reduzir o nível de bactérias subgingivais e melhorar o status periodontal, mas raramente é possível remover completamente os patógenos periodontais. A eficácia da RAR depende da profundidade da bolsa, extensão e tipo de defeito ósseo, a habilidade do profissional, duração da terapêutica e colaboração do paciente. E algumas variáveis podem estar associadas às falhas na eliminação dos patógenos e às limitações da terapia mecânica: dificuldade de acesso dos raspadores às áreas mais apicais da BP, principalmente nas bolsas profundas, *as que excedem 5 mm* de profundidade, o que significa uma potencial invasão de bactérias nos tecidos periodontais, regiões de furca, dentes com raízes múltiplas, concavidades, áreas interproximais falha técnica profissional, variações anatômicas radiculares, a fatores sistêmicos e da resposta do hospedeiro. Há também os efeitos secundários, como recessão gengival, perda de substância dentária e hipersensibilidade dentinária (OBEID *et al.*, 2004). Além disso, alguns patógenos podem persistir no cimento da raiz e nos túbulos dentinários ou migrar de reservatórios dentro da boca para áreas periodontais, outros possuem a capacidade de invadir as células do tecido conjuntivo subepitelial e recolonizar as superfícies dentárias após a terapia, principalmente, quando combinado com um controle de placa supragengival

deficiente Em muitos casos de pacientes infectados com Aa não podem ser tratados de forma confiável e preditiva por terapia mecânica sozinha (HERRERA *et al.*, 2012, NICKLES *et al.*, 2017; SANZ *et al.*, 2012).

Em longo prazo, a RAR frequente pode resultar efeito adverso por remover estrutura do dente e produzir sensibilidade dentinária e "aparência de vidro" na interface coroa-raiz (RIFFLE, 1952). Isto pode ser um problema na terapia de manutenção. O indivíduo que tem aumento da sensibilidade dentinária durante a terapia não-cirúrgica / cirúrgica pode apresentar instrumentação mais dolorosa. Isto pode afetar a adesão ao tratamento em longo prazo e também pode aumentar o tempo envolvido em cada visita de manutenção. Pacientes com sensibilidade podem ser os candidatos ideais a terapia local, aumentando o intervalo de tempo entre a instrumentação subgingival dolorosa, intercalando com a utilização de antibiótico administrado localmente (MCCOLL *et al.*, 2006).

A RAR potencialmente pode causar hemorragia excessiva e bacteremia transitória, o que pode resultar em infecção de outros órgãos, como o coração. A bacteremia pode ocorrer imediatamente após RAR a uma taxa de até 70%, com Pg mostrando a maior frequência no sangue. Um antibiótico subsequente e adjuvante pode não prevenir a ocorrência de bacteremia, embora estudos mostrem que a administração tópica de agentes antibacterianos pode reduzir a incidência e a magnitude da bacteremia causada por RAR ou outra cirurgia odontológica (DENG *et al.*, 2017).

As espécies *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Aa* foram detectadas nas BPs mesmo após terapia mecânica (MOMBELLI *et al.*, 2000). A manutenção da terapia mecânica é importante, pois o biofilme supragengival pode servir como reservatório para a recolonização de sítios tratados. Além disso, Yilmaz (2008) afirmou que Pg, além da capacidade invasiva, consegue se multiplicar e persistir no interior de células epiteliais, o que contribui para a recolonização. Uma abordagem microbiológica à terapia periodontal tem como objetivo primordial suprimir bactérias patogênicas específicas, especialmente aqueles abrigados no fundo das bolsas profundas ou em túbulos dentinários e não podem ser removidas pelo tratamento mecânico, permitindo a recolonização posterior de uma microbiota compatível com saúde. A escolha do antibiótico associada ao tratamento periodontal

deve levar em consideração: a classificação da periodontite, as condições sistêmicas do indivíduo, os microrganismos envolvidos, o local da infecção, a suscetibilidade, toxicidade e via de administração de fármaco. Apesar disso, insucessos na terapia antimicrobiana podem estar relacionados à escolha inapropriada do antibiótico, falha no cálculo da dosagem do mesmo, incapacidade do antibiótico penetrar nos sítios da infecção, fatores locais desfavoráveis, limitada vascularização local, falta de colaboração do indivíduo e custo do tratamento (KAUR *et al.*, 2014)

Está bem estabelecido que a progressão da periodontite é dependente da presença do biofilme subgengival. No entanto, a etiopatogenicidade periodontal ainda não está totalmente esclarecida. Além disso, as limitações dos tratamentos usuais na resolução da periodontite têm inspirado muitos pesquisadores a investigar a formação e os mecanismos reguladores da etiopatogênese da periodontite com o objetivo principal de desenvolver e aprimorar ações específicas dos quimioterápicos antimicrobianos a fim de minimizar a ocorrência de insucessos terapêuticos (KINANE *et al.*, 2011, WADE *et al.*, 2013).

Neste contexto, diferentes terapias antibióticas sistêmicas ou locais foram introduzidas como adjuvantes ao tratamento não cirúrgico. Os antibióticos sistêmicos podem alcançar microrganismos amplamente distribuídos pela cavidade bucal. A detecção do patógeno-chave Aa é essencial para saber se os antibióticos sistêmicos devem ser prescritos adicionalmente a terapia mecânica (RAMICH *et al.*, 2015). Apesar dos bons resultados obtidos com antibióticos sistêmicos, há várias limitações inerentes nesta via de administração. O uso repetido, em longo prazo, de antibióticos sistêmicos pode ocorrer o desenvolvimento de resistência bacteriana e infecções sobrepostas, falta de adesão do paciente, ocorre elevado pico da concentração do antibiótico no plasma, que podem ser associada com como efeitos colaterais, como a hipersensibilidade, intolerância gastrintestinal, náuseas, diarreia, dor abdominal, colite pseudomembranosa, febre, taquicardia, ototoxicidade e nefrotoxicidade, a concentração do plasma declina rapidamente para o nível subterapêutico, a incapacidade de o princípio ativo ser retido pelo período necessário e ocorrer baixa absorção nos locais-alvo e a administração do fármaco em longo prazo para compensar a insuficiente concentração do fármaco na lesão

(concentração local muito mais baixa do que na circulação sistêmica). A absorção gastrointestinal imprevisível associada à permeabilidade variável da bolsa para antibióticos administrados oralmente podem ser responsáveis por variabilidade de a resposta clínica aos antibióticos oral (KATARIA *et al.*, 2014).

Considerando esses aspectos negativos, o uso de sistemas de administração local de antibiótico ou de agentes antissépticos fornece uma solução útil para essas complicações. Oferecem as vantagens de proporcionar um melhor acesso, melhorar as condições periodontais clínicas ao matar quimicamente as bactérias e permitem que os agentes terapêuticos sejam entregues diretamente no local da doença. O uso eficaz destes agentes requer uma concentração adequada do fármaco no local da infecção durante período de tempo suficiente para permitir ao agente eliminar os periodontopatógenos (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1996) A eficácia de um sistema pode ser medida então, pela liberação de antibiótico ativo em concentrações elevadas do que os níveis de MIC, com dosagem reduzida, permite o estabelecimento de um reservatório do princípio ativo capaz de manter uma alta concentração antibacteriana por período de tempo suficientemente prolongado, geralmente 7-10 dias, na região alvo 6, uma vez que a doença está restrita à bolsa periodontal. A bolsa atua como um reservatório natural e de fácil acesso para inserção de um dispositivo de liberação local. Ao mesmo tempo este sistema, minimiza a exposição total do corpo ao fármaco e, desta forma, de efeitos adversos, da toxicidade e hipersensibilidade sistêmica, e também com menor risco de desenvolvimento de resistência bacteriana associada à antibioticoterapia sistêmica. As formulações locais sendo mais específicas podem até mesmo afastar a necessidade da terapia medicamentosa sistêmica. Além disso, permitem menos aplicações, elevada aceitabilidade do paciente (SLOTS, 2004) As variáveis de resultado centradas no paciente, como a redução do tempo de tratamento, são consideradas importantes na avaliação do resultado do tratamento nos dias de hoje (IOANNOU *et al.*, 2010)

A principal vantagem desta via de aplicação é a possibilidade de aumentar a concentração do agente antimicrobiano na bolsa e, assim, no Fluido Crevicular Gengival (FCG), ao passo que na via sistêmica a concentração do antibiótico pode ser mantida relativamente baixa. Sistemas de liberação subgengival podem fornecer

níveis de antibióticos da ordem de 1-2 vezes maior do que administração por via oral. A distribuição do fármaco na bolsa é favorecida pelo FCG, um exsudato do soro<sup>29</sup>, que atua como meio de lixiviação na direção coronal do dente para esvaziar na cavidade bucal (JAIN *et al.*, 2008, GARG *et al.*, 2011, HERRERA *et al.*, 2012). Na periodontite a taxa média de fluxo do FCG está aumentada, resultando em uma difusão mais rápida do fármaco do dispositivo de liberação. Assim, a concentração deste deve ser mais alta no estágio inicial da liberação, para que o nível terapêutico seja alcançado o mais rápido possível, mantendo-se estável durante todo o período do tratamento (SOSKOLONE E FREIDMAN, 1996, HERRERA *et al.*, 2012).

Tem sido usado como terapia única ou como complemento do tratamento periodontal mecânico e cirúrgico, particularmente em locais com bolsas periodontais mais profundas. Em ensaios clínicos previamente publicados, os antibióticos administrados localmente foram usados como único tratamento para a periodontite e provaram melhorar os sintomas clínicos da periodontite, como OS. Entretanto, sabe-se que as bactérias são organizadas em biofilmes quando presentes na bolsa periodontal. É bem conhecido que um biofilme subgengival bem organizado representa uma estrutura capaz de resistir à penetração dos antibióticos e que, com a ruptura deste biofilme antes da aplicação tópica de um antibiótico pode aumentar a sua eficácia. Além disso, estes biofilmes requerem uma concentração significativamente maior de antimicrobianos para matar as bactérias. Cargill *et al.* (1992) descobriram que as *legionellae* em biofilmes eram 135 vezes mais resistentes à iodação quando comparadas aos microorganismos que cresciam de forma não organizada ou planctônica (*in vitro*). Estas são fortes indicações que os antimicrobianos administrados localmente devem ser usados adjuntivamente com instrumentação mecânica para interromper os biofilmes. A RAR e os antibióticos administrados localmente são mais frequentemente adotados como uma terapia combinatória, o que pode reduzir ainda mais a carga bacteriana. Portanto, em condições de colonização aumentada de microorganismos, o uso de sistemas liberação controlada, é plausível e justificado (SANDHYA *et al.*, 2011).

Entre os anos 60 e 80, foram desenvolvidos os primeiros Sistemas para Liberação Controlada de Fármacos (SLFs) ou Dispositivos de Liberação Local (DLL) os quais envolvem diferentes aspectos multidisciplinares. Os (DLL) estão

classificados como sistemas de liberação sustentada e controlada (LANGER E PEPPAS, 1981). O sistema de liberação sustentada promove a liberação do fármaco por um período de menos de 24 horas, enquanto que o sistema de liberação controlada o faz por um período maior que 24 horas.

Há cerca de 30 anos, foram introduzidos agentes anti-infecciosos administrados localmente. O conceito de liberação controlada de entrega local de agentes antimicrobianos terapêuticos foi desenvolvido em um conceito viável, principalmente, pelo Dr. Max Goodson, cujo primeiro dispositivo de entrega envolveu fibras ocas de acetato de celulose preenchido com tetraciclina (TC) a 25%. Em 1984, Addy e Langeroudi estudaram o metronidazol e a clorexidina em tiras de metilmetacrilato e verificaram a efetividade deste dispositivo na redução da microbiota subgengival. Addy *et al.* (1988), compararam o uso de tiras de acrílico contendo diferentes antimicrobianos (clorexidina, metronidazol e TC) com RAR em 75 pacientes com bolsas periodontais = 6mm. A profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e perda de inserção foram avaliados no início e após 3 meses.

Rams e Slots (1996) afirmaram que as doenças periodontais poderiam ser controladas pela supressão de algumas espécies de microrganismos do biofilme subgengival que são considerados patogênicos e pela interferência na recolonização destes sítios por estas bactérias. Observaram que o debridamento mecânico/cirúrgico na região radicular não erradica certos microorganismos como Aa, Pg, Pi e B. forsythus do ecossistema subgengival devido à capacidade invasiva para as células epiteliais e do tecido conjuntivo. Com o intuito de intensificar a ação da RAR no tratamento das periodontopatias, foi proposto o emprego de agentes antimicrobianos tópicos como os bochechos bucais ou a irrigação do sulco gengival e a colocação de dispositivos que liberem lenta e gradualmente essas substâncias dentro da bolsa periodontal. Estes veículos superaram muitos dos problemas inerentes a outros métodos de administração de fármacos.

A administração de antimicrobianos liberados no interior da bolsa periodontal é uma alternativa para minimizar a distribuição de antibióticos no organismo e, por conseguinte, aumentar a sua concentração no local-alvo evitando os efeitos colaterais sistêmicos dos antibióticos. O DLL pode proporcionar doses terapêuticas

do agente 100 vezes superiores que a terapia sistêmica. Uma única administração de uma pequena quantidade do agente antibacteriano pode manter concentrações terapêuticas dentro do FCG por um período mais longo do que qualquer outro modo de entrega. No estudo de Priyanka *et al.* (2015) o fármaco foi detectado no FCG até 7 semanas após o DLL, satisfazendo assim os critérios para liberação controlada de fármaco. Além disso, a taxa de liberação do fármaco pode ser controlada com precisão (AHUJA *et al.*, 2012, FINKELMAN, 2013, ARWEILER *et al.*, 2014).

As bactérias em bolsas profundas são difíceis de eliminar com a RAR, assim, pode-se sugerir o uso adjunto de DLL em sítios profundos que pode inibir a recolonização de bactérias nesses locais. Isto está de acordo com Haffajeet *et al.* (1997) que relataram que os locais que apresentaram ganhos de  $\geq 2$  mm após RAR mostraram uma redução significativa dos periodontopatógenos: Pg, Tf, Aa. O período de reavaliação das bactérias subgengivais no estudo de Priyanka *et al.* (2015) foi de 3 meses, o que é mais longo do que o período esperado de 42 dias para a recolonização. Priyanka *et al.* (2015) concluíram que o uso do DLL pode manter níveis significativamente baixos de Pg, Tf e Aa, mesmo após este período, enquanto o grupo controle (somente RAR) não poderia.

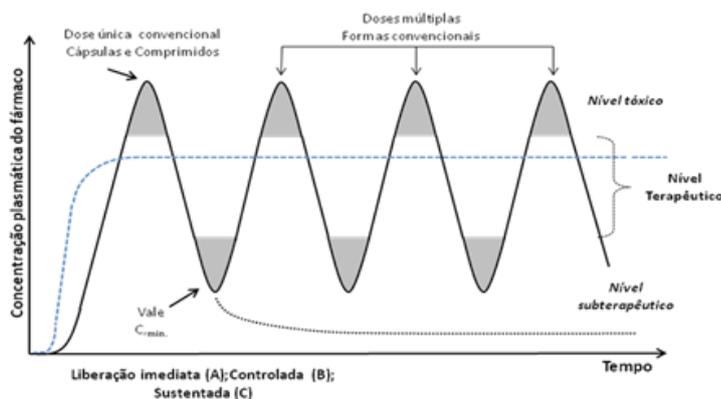
Duas revisões sistemáticas com meta-análise (BONITO *et al.*, 2005; HANES *et al.*, 2003) de estudos que avaliaram o efeito de antimicrobianos administrados localmente como terapia adjuvante a RAR revelaram melhores resultados clínicos, com maior redução de PS e / ou ganho de inserção clínica em comparação com RAR sozinha. Principalmente com o uso de TCs (IOANNOU *et al.* 2010).

Os estudos iniciais utilizando TC entregue localmente foram promissores, conseqüentemente, outros antibióticos em diferentes de veículos também foram desenvolvidos em sistemas de administração de liberação sustentada para tratamento periodontal. No caso dos produtos de aplicação tópica, a liberação sustentada é importante para as substâncias potencialmente irritantes, em concentrações elevadas e que devam suprir o tecido por um período prolongado de tempo. A liberação do fármaco depende da dessorção, da difusão do princípio ativo através de uma matriz polimérica, da erosão desta matriz ou da combinação dos processos de difusão e erosão (RAJEWSKI E STELLA, 1996). Terapia antimicrobiana local por sistema liberação sustentada tem sido uma área de

desenvolvimento farmacêutico e pesquisa clínica ativa desde os relatos pioneiros de Goodson *et al.* (1979) e Lindhe *et al.* (1979). A liberação sustentada disponibiliza, de forma mais lenta, elevadas concentrações do fármaco e o mantém estável, em níveis terapêuticos, por um tempo maior no interior da bolsa periodontal, reduzindo a frequência de dosagem e minimizando as chances de resistência bacteriana. Além disso, modula a resposta inflamatória, e dessa forma, limita a destruição do tecido, aumentando a eficácia dos antimicrobianos. Além de diminuir os efeitos colaterais e citotóxicos do fármaco. Em casos de dispositivos biodegradáveis, a vantagem de não ter que retirá-los, assegurando melhor adesão do indivíduo ao tratamento. A literatura demonstra a eficácia e vantagens destes sistemas adjuntos aos tratamentos tradicionais em indivíduos acometidos por periodontite (MOURA *et al.*, 2015, JEPSEN e JEPSEN, 2016).

Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, este se mantém dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, sendo assim, mais eficaz do que as formas convencionais. A dose terapêutica descreve um platô que diminui lentamente ao longo do tempo. Os SLFs permitem o uso de baixas doses em altas concentrações, menor número de aplicações e têm o objetivo de manter a concentração do fármaco em sua faixa de ação terapêutica no sítio alvo por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. O grande desafio terapêutico é conseguir um sistema antimicrobiano eficaz que mantenha a mínima concentração inibitória (MIC) por um determinado período, reduza a incidência de reinfecção e de efeitos adversos, sem resistência bacteriana (USKOKOVIC, 2015).

A diferença de concentração efetiva, em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser visualizada na Figura 1.



Fonte: Joel J. Passos LEMB-DQ-UFMG

**Figura 1.** Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x controlada.

O tipo de sistema de entrega influencia a farmacocinética da liberação de antibiótico. Dentre os sistemas de liberação de antimicrobianos que empregam fitas ou fibras não degradáveis: de tetraciclina (Actisite®); géis de minociclina (Perioclina®) e metronidazol (Elyzol®); sistema pó-líquido de doxiciclina (Atridox®) e pastilhas de clorexidina (Periochip®) Killoy e Polson (1998). SLFs biodegradáveis são geralmente poliméricos ou proteicos e submetem-se a degradação natural em resposta aos componentes do fluido gengival. A forma desses sistemas inseridos subgengivalmente têm sido fibras de polímeros, pós, tiras, filmes, fitas, pastas, géis e pomadas. Vários agentes entregues localmente que são utilizados com sucesso incluem fibras de tetraciclina, 10% de doxiciclina, 2% de minociclina, metronidazol e gluconato de clorhexidina (VENNILA *et al.*, 2016).

A produção de dispositivos locais mais próximos das condições ideais continua como objetivo farmacológico, bem como conhecer os mecanismos pelos quais esses agentes interagem com as células dos microorganismos patogênicos e com as próprias células do organismo. De acordo com Ciancio, em 1999, algumas características deveriam ser consideradas na escolha de um antimicrobiano de liberação local na terapia periodontal. A eficácia dos sistemas subgengivais pode ser melhorada se o transportador de fármacos for de fácil aplicação, alcançar a base da bolsa, ficar retido, for totalmente biodegradado ou disperso e causar pouca ou nenhuma irritação. A entrega de um agente terapêutico periodontal deve seguir

princípios farmacocinéticos fundamentais e matar ou inibir a flora patogênica. Ser efetivo contra patógenos periodontais, ser clinicamente efetivo como terapia coadjuvante, seguro para os dentes e tecidos moles. Atingir concentração adequada e os níveis terapêuticos do fármaco devem ser estabelecidos e mantidos no local dos sítios periodontais durante um período adequado para eliminar os patógenos, não causar resistência bacteriana. O método de administração de fármaco deve facilitar a adesão do paciente e o agente não deve ser tóxico e causar mínimos efeitos adversos (KIM *et al.*, 2002)

## 1.2. Doxiciclina

A escolha do agente antimicrobiano deve ser baseada na etiologia bacteriana da infecção. A clortetraciclina (7-clortetraciclina) foi o primeiro antibiótico da família das tetraciclinas (TCs) utilizado clinicamente, sendo descoberta em 1948 pelo micologista Benjamin Duggar, que observou atividade antimicrobiana incomum em organismos que formavam uma colônia amarelo-ouro. Tais organismos foram designados como *Streptomyces aureofaciens* e o produto aureomicina (ROBERTS, 1996). Em 1950, a oxitetraciclina foi isolada de *Streptomyces rimosus* e três anos depois, a TC (PM 444,45g) foi produzida pela desalogenação catalítica da clortetraciclina. A TC apresenta estrutura química que consiste em um núcleo hidronaftaceno com quatro anéis fundidos, os análogos são derivados a partir de substituições na estrutura básica (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

A absorção por via oral da TC varia entre 75% e 77% da dose ingerida e, sua distribuição ocorre pela maioria dos líquidos do organismo. Apresenta tendência a localizar-se nos ossos, fígado, baço, tumores e dentes. A meia-vida da TC é de 6 a 11 horas, sendo que as concentrações terapêuticas são alcançadas após 2 a 3 dias. Sua eliminação ocorre de forma inalterada por via renal e fecal, podendo ser excretada também pelo leite materno. Sua união às proteínas é baixa a moderada (MOREJON *et al.*, 2003). Como possui a capacidade de atravessar a placenta, seu uso não é recomendado durante a segunda metade da gravidez, pois pode causar descoloração permanente dos dentes, hipoplasia do esmalte e inibição do

crescimento ósseo do feto. A TC pode causar efeitos adversos característicos como reações de hipersensibilidade (urticária, edema angioneurótico, anafilaxia, lesões eritematosas e maculopapulares); náusea, vômito, diarreia, enterocolite, esofagite, Trombocitopenia, neutropenia e eosinofilia, reações de fotossensibilidade (RIBERA, 2004).

A TC é um antibiótico bacteriostático, de largo espectro de ação, eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias, anaeróbias facultativas, bactérias anaeróbias estritas e até contra alguns protozoários. Os microorganismos são considerados sensíveis se a MIC não for superior a 4,0 µg/ml, e intermediários se a MIC estiver entre 4,0 e 12,5 µg/ml (ROBERTS, 1996). Age no metabolismo das bactérias impedindo sua nutrição, desenvolvimento e reprodução. Exerce a sua atividade antibacteriana através da inibição específica da síntese proteica bacteriana, liga-se de maneira irreversível ao receptor na subunidade 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador, inibindo a formação do complexo t-RNA-aminoacil-RNA-ribossomo durante a tradução gênica. A síntese de proteínas é inibida na bactéria, impedindo a replicação e ocasionando a morte celular. O ribossoma eucariota das células humanas não é afetado, pois é substancialmente diferente (CUNHA *et al.*, 1982).

Durante vários anos, as TCs têm sido defendidas como adjuvantes úteis no tratamento da periodontite. Gordon e Walker (1993) demonstraram que a RAR por si só foi ineficiente para eliminar a *Aa* e, coadjuvada com a TC e controles periódicos, apresentou melhores resultados clínicos e microbiológicos. MacNeill *et al.* (1997) mostraram que utilizada em altas concentrações, a tetraciclina hidrocloreídica (TCN) inibe o crescimento de *Candida albicans*.

É sabido que as TCs possuem forte afinidade a cátions bivalentes e trivalentes, o que permite a formação de complexos com cálcio encontrado no tecido ósseo, esmalte e dentina durante o processo de calcificação destes tecidos. Sua união com o cálcio é reversível, conferindo-lhe substantividade, capacidade de ser liberada lentamente, exercendo sua atividade antimicrobiana (ROBERTS, 1996; THOMAS *et al.*, 2000).

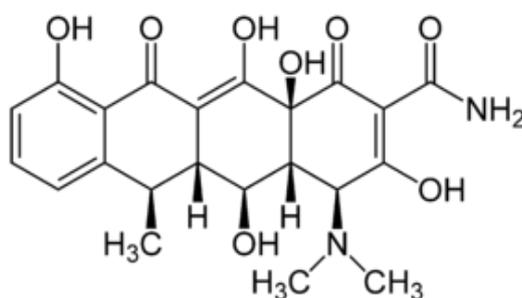
Além do efeito antibacteriano, a TC possui propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, reduz a atividade fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares e a quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos (THOMAS *et al.*, 2000). Apresenta ainda, ação anti-colagenase e anti-lipase, favorecendo o reparo do tecido conjuntivo, que é clinicamente traduzido pelo aumento da resistência à sondagem (RAMAMURTHY *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm relatado o potencial da TC e seus análogos na indução da produção de matriz óssea por OBs (incluindo síntese de novo colágeno), inibição da função dos OCs e indução da apoptose nos OCs (BETTANY *et al.*, 2000).

Doxiciclina, uma TC semissintética, foi escolhida como antibiótico no presente estudo por ser o fármaco mais empregado no sistema de liberação local, como terapia adjuvante à periodontite, apresentando bons resultados clínicos por causa de seus efeitos quimioterápicos no osso e propriedade iônica (carga positiva), é um fármaco solubilizado em água por ionização da DOX hidrofóbica, que leva à formação de um complexo iônico (HYUN *et al.*, 2014). Ela apresenta eficácia conhecida contra periodontopatógenos, como Aa, Pg e Tf e eficácia clínica na modulação dos sinais clínicos da periodontite em humanos e menos efeitos colaterais quando comparado à TC (POLSON *et al.*, 1996).

A DOX também é conhecida por inibir as MMPs (colagenase e gelatinase) e a reabsorção óssea promovendo um impacto adicional positivo no processo de reparo ósseo. A reabsorção óssea ocorre principalmente através da inibição da colagenase dos OCs, que é mediada pela regulação do cálcio citoplasmático. Propriedades anti-inflamatórias foram também relatadas, devido à sua capacidade de suprimir os leucócitos polimorfonucleares, por sua ação de limpeza ou bloqueando prostaglandina E2 (GAMAL *et al.*, 2013; HOLMES *et al.*, 2004, PARK, 2011, KHANDAN *et al.*, 2015).

Stephens *et al.* (1958) observaram que a remoção do grupo 6-hidroxila da TC resultaria na formação da 6-deoxitetraciclina, apresenta propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas únicas e com atividade antibacteriana maior que as TCs originais. Em 1962, Schach Von Wittenau *et al.* relataram o processo de síntese da a-6-deoxi-5-oxitetraciclina, denominada doxiciclina. O fármaco é obtido semissinteticamente a partir da oxitetraciclina ou metaciclina, sendo isolado como

cloridrato com peso molecular de 462,46g. Segundo os autores a DOX é um isômero estrutural da TC, diferindo apenas quanto a posição do grupo hidroxila 1: situado no carbono 6 na TC e no carbono 5 na DOX, característica que lhe confere maior estabilidade que as TCs. Tem aspecto de pó amarelo cristalino, é facilmente solúvel em água e metanol. A sua fórmula química é:  $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O$  (OBAIDAT *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Estrutura química da doxicilina. Fonte: OBAIDAT *et al.*, 2010.

As principais vantagens da DOX sobre a TC são o aumento da reabsorção via oral, da meia-vida prolongada no soro e menor efeitos secundários gastrointestinais (PASCALE *et al.*, 1986). A DOX possui alta polaridade e solubilidade na camada lipídica, fatores importantes na sua ação antibacteriana. Sua boa biodisponibilidade permite difundir-se por todo organismo, atingindo os vários órgãos, incluindo o microambiente ósseo. Como a DOX possui elevado grau de lipossolubilidade (5 a 10 vezes mais lipossolúvel que as demais TCs) e alta capacidade de se ligar às proteínas plasmáticas, apresenta tempo prolongado de meia-vida (entre 18 a 23 horas), sendo maior que a TC (entre 6 a 11 horas). Ela é altamente estável no soro humano, não se degradando para formar epianidro, logo baixas concentrações no plasma são suficientes para se atingir a MIC (6  $\mu\text{g/mL}$ ). Ela apresenta mais afinidade com a solução plasmática do que com a membrana celular, por isso há maior liberação do fármaco. Apresenta também pouca afinidade de ligação ao cálcio, por isso, ao contrário de outras TCs, a absorção da DOX não é alterada pela ingestão de alimentos ou leite (SEYMOUR *et al.*, 1995).

Fabre *et al.* (1966) relatam que, ao contrário das demais TCs, pouco absorvidas pelo organismo, a DOX é quase completamente absorvida (93%) na porção superior do trato gastrointestinal após administração oral. O seu ponto isoelétrico e a máxima lipossolubilidade ocorrem em Ph 5.5, sugerindo um pico de absorção no duodeno. A meia-vida de absorção da droga é de aproximadamente 50 minutos, sendo possível detectá-la no soro 30 minutos após administração oral. O pico sérico da droga ocorre 2 horas após sua ingestão. Ela é absorvida e excretada mais lentamente, favorecendo ação mais prolongada. Estas propriedades permitem frequência de administração menor (MUNDARGI *et al.*, 2007). Em 1971, Fabre *et al.* relataram que a DOX é parcialmente inativada pelo metabolismo hepático. Como não há nenhum metabolismo significativo deste fármaco em humanos, é principalmente eliminada de forma inalterada pelas as vias renais, biliares e fecal e também no leite materno (DENIC *et al.*, 2013). Ela não se acumula no organismo, é excretada totalmente, podendo ser indicada a indivíduos com distúrbios renais. As concentrações obtidas no pulmão são quase duas vezes superiores às concentrações plasmáticas, o quê demonstra a ação do fármaco no órgão-alvo (OBAIDAT *et al.*, 2010).

Usada como cloridrato, a DOX é uma TC bacteriostática de amplo espectro, exerce ação antimicrobiana pela inibição da síntese proteica bacteriana devido à interrupção da transferência do RNA mensageiro nos ribossomos (CUNHA *et al.* 1982). Sugere-se ainda que a propriedade lipossolúvel da DOX facilita-lhe a difusão através da membrana citoplasmática bacteriana, promovendo suscetibilidade ao fármaco e a lise bacteriana (SÚAREZ *et al.*, 2014). *In vitro*, *Pg*, *Pi*, *Campylobacter reto* e *Fn*, associadas à doença periodontal, foram susceptíveis a DOX na concentração de 6,0 ug / mL (SLOTS *et al.*, 2004).

Feres *et al.* (1999) avaliaram a proporção e prevalência de bactérias periodontopatogênicas resistentes à DOX. Foram selecionados 20 indivíduos portadores de periodontite e divididos em dois grupos: grupo controle (pacientes receberam RAR) e grupo teste (pacientes receberam RAR e administração sistêmica de DOX, 100mg/dia por 14 dias). Os resultados mostraram que as espécies bacterianas mais resistentes foram: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces gerencseriae*, *Streptococcus constellatus*, *Actinomyces*

*naeslundii* genospecies, *Streptococcus gordonii*, *Eikenella corrodens* and *Actinomyces naeslundii* genospecies.

A DOX via sistêmica pode ser entregue através do soro para a BP e pode afetar microorganismos invasivos do tecido. A capacidade de a DOX concentrar-se em tecidos é bem conhecida, ela se acumula no tecido gengival e no microambiente ósseo. Ela também pode afetar reservatórios bacterianos tais como a saliva, onde atinge nível de concentração detectável (AGNIHOTRI e GAUR, 2012). É frequentemente empregada no tratamento de infecções clínicas, tanto na medicina quanto na odontologia. Na odontologia, é utilizada no tratamento de osteomielite (OH *et al.*, 2016), especialmente na terapêutica periodontal, em função: da eficácia em suprimir organismos anaeróbios Gram-negativos que existem no biofilme subgengival; é um dos mais importantes agentes antimicrobianos que tem a capacidade de se concentrar no FCG em altas concentrações, em níveis de 5 a 10 vezes superiores aos encontrados no soro, uma propriedade que aumenta a sua ação contra os micróbios; apresenta adsorção e exibe um alto grau de substantividade, capacidade de ligação à superfície do dente, ligando-se ao cimento e dentina da raiz doentes, atuando como um reservatório enquanto libera lentamente o antibiótico em uma forma biologicamente ativa acima da MIC para ambientes adjacentes. Os fibroblastos também funcionam como reservatórios de DOX na gengiva. Estas características permitem prolongar a eficácia terapêutica da DOX durante vários dias após deixar de ser administrada ao paciente, sem perder a sua ação antimicrobiana. Aplicação tópica da DOX promove o condicionamento da dentina, permitindo a ligação da fibrina, favorecendo a formação de uma nova fixação e promove também a fixação de fibroblastos à superfície radicular, resultando no aumento da produção de colágeno, do osso e da reparação periodontal. Na medicina, tem sido usada no tratamento da osteoporose, osteoartrite e de patologias caracterizadas por excessiva atividade de MMP, como colagenase e gelatinase (DENIC *et al.*, 2013; KHANDAN *et al.*, 2015, MOURA *et al.*, 2017).

Embora inicialmente atribuída às suas propriedades antimicrobianas, a eficácia clínica das TCs na periodontite, deve-se também às propriedades independentes da ação antimicrobiana que parecem modular a resposta do hospedeiro como a atividade anti-inflamatória intrínseca, ao inibir a atividade das

MMPs. Foi na década de 80 que Golub *et al.* (1991) descobriram estes efeitos farmacológicos das TCs. Golub *et al.* (1994) demonstraram que a DOX, aplicada via sistêmica e em baixas concentrações, possui propriedades não-antibacterianas, mas com capacidade de inibir MMPs no tecido gengival humano inflamado. A DOX é considerada a anti-colagenase mais potente das TCs, e o inibidor mais potente de MMPs. A superioridade relativa da DOX, como inibidor da MMP, é devido à sua maior afinidade pelo  $Zn^{+2}$ . As MMPs são enzimas colagenolíticas que estão envolvidas em muitos processos fisiopatológicos, incluindo inflamação, destruição do colágeno e da fibronectina, que facilita a reparação do ligamento periodontal. A principal função das MMPs é a destruição das proteínas das células das membranas plasmáticas ou da matriz extracelular formada por proteínas colágenas. Além disso, as MMPs desempenham um papel essencial na proliferação e diferenciação das células do tecido conjuntivo, como as osteoblásticas (PETERSON, 2004, KHANDAN *et al.*, 2015).

As MMPs são produzidas por diversos tipos de células incluindo macrófagos, fibroblastos gengivais, células epiteliais e endoteliais, e neutrófilos. Colagenase intersticial, um subgrupo importante de MMP, é dividida em três grupos geneticamente distintos: fibroblasto-colagenase (MMP-1), neutrófilos-colagenase (MMP-8), e colagenase-3 (MMP-13). Estudos demonstraram níveis elevados de colagenase nos tecidos gengivais inflamados e no FCG de bolsas periodontais. A MMP-8 é responsável por uma parte substancial da destruição causada pela resposta do hospedeiro. A MMP-13 é expressa durante o desenvolvimento ósseo e gengival e tem sido detectada no epitélio sulcular gengival de pacientes com PC. A Produção de enzimas, como as MMPs e citocinas e de outros mediadores pelas células hospedeiras contribuem para as reações imunitárias e inflamatórias exageradas vistas na PC e representa a maior parte da degradação do tecido do conjuntivo durante doença ativa, porque a RAR não age diretamente na resposta do hospedeiro. Métodos foram desenvolvidos para regular a resposta exagerada do hospedeiro em conjunto com a remoção mecânica da carga microbiana (TUTER *et al.*, 2010).

Os efeitos não antimicrobianos da DOX ocorrem por mecanismos diretos e indiretos. Exerce sua ação anti-inflamatória ou anti-proteolítica por inibição direta da

atividade colagenolítica das MMPs e indireta por inibição da sua síntese. A inibição direta deve-se à sua capacidade de ligação aos íons metálicos ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) presentes nas MMPs e que são necessários para a degradação da matriz. Ao inibirem diretamente a ação das colagenases, as tetraciclinas impedem a destruição do tecido conjuntivo e diminuem de forma indireta a taxa de reabsorção óssea, pois são potentes inibidores da função osteoclástica, facilitando a reparação do tecido conjuntivo representado, clinicamente, pelo aumento da resistência à sondagem periodontal. A inibição indireta das MMPs se dá pela inibição das proteases de serina (SERPINs), pela eliminação ou bloqueio dos fatores pró-inflamatórios (prostaglandina E2, interleucinas) e inativação das proteinases bacterianas, que contribuem para degradação tecidual em indivíduos com periodontite. Impede também a proliferação de células mononucleares, de linfócitos e dos leucócitos polimorfonucleares. A eficácia de inibição da TC contra as MMPs depende do tipo de TC, da MMP e do PH (SAPORSKI *et al.*, 2010, GRIFFIN *et al.*, 2012).

Outra propriedade não antimicrobiana da DOX bem caracterizada é a sua capacidade de sequestrar Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). As ROS são produzidas sob muitas condições patológicas e podem conduzir à destruição oxidativa, pois são altamente reativas. A eliminação desses radicais livres é semelhante à ação da vitamina E. A DOX possui também propriedades anti-apoptóticas, aumenta a sobrevivência de neurônios do hipocampo após isquemia cerebral. Estudos demonstram que o bloqueio da cascata apoptótica, pode salvar miócitos e reduzir a gravidade do infarto, e inibir o remodelamento vascular induzido pela hipertensão arterial. É muito utilizada e estudada como agente antitumoral, pois inibe a proliferação de linhagens de osteosarcomas, induz a apoptose de linhagens de melanoma e ajuda evitar a progressão de câncer de mama (CASTRO *et al.*, 2010).

Estudos relataram que a DOX apresenta um espectro antimicrobiano apropriado para o tratamento de infecções ósseas e um efeito osteogênico característico capaz de diminuir a perda óssea e aumentar a formação de osso e por esta razão tem sido empregada no tratamento de doenças de ósseas. Ela funciona principalmente através da inibição da osteoclasto-colagenase, que é mediada pela regulação alterada do cálcio citoplasmático (RAMAMURTHY *et al.*, 2002) Ela impede

a reabsorção óssea de forma direta, induzindo a apoptose dos osteoclastos e indireta, inibindo o Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B Ligante (RANKL) na osteoclastogênese. Além disso, favorece a formação de tecido ósseo pela ativação dos osteoblastos. A capacidade da DOX em concentrar-se em tecidos, incluindo o microambiente ósseo, é bem conhecida (GAMAL *et al.*, 2013; HOLMES *et al.*, 2004, PARK, 2011, KHANDAN *et al.*, 2015).

A capacidade de TCs para inibirem diretamente as já ativadas MMPs ligando-se a íons metálicos de cálcio e zinco, no domínio catalítico das enzimas.1-3,5 Mecanismos pleiotrópicos adicionais logo se tornaram evidentes, tal como a capacidade destes medicamentos para regular negativamente a expressão de precursores inativos pro-MMPs e para bloquear a ativação destes zimógenos. Duas estratégias foram propostas para explicar esta não reconhecida previamente, propriedade não antibiótica das TCs em novas terapias para inibir destruição patologicamente excessiva de tecido conectivo, incluindo a reabsorção óssea (HOLMES *et al.*, 2004, PARK, 2011, KHANDAN *et al.*, 2015).

Uma estratégia era modificar quimicamente a molécula de TC para eliminar as suas propriedades antibióticas para manter e até mesmo melhorar as propriedades inibitórias das MMPs, isto é, as TCs quimicamente modificadas (TQMs) de 1 a 10. Estudos de TCs e TQMs descobriram que inibem a reabsorção óssea em culturas de órgãos e em modelos animais de doenças com deficiência óssea como a osteoporose e diabetes. Estes efeitos foram associados, em parte, às propriedades inibidoras da MMPs destes medicamentos. Esses fármacos também "normalizaram" o turnover ósseo patológico pela inibição da atividade dos osteoclastos e da reabsorção óssea e pelo aumento da atividade dos OBs, síntese de colágeno tipo I e formação óssea (GOLUB *et al.* 2008).

A segunda estratégia foi abaixar a dose oral de DOX, Dose Subantimicrobial ou Subterapêutica de DOX (DSD) ou Baixa Dose de DOX (BDD) em Sistemas para Liberação Controlada de Fármacos (SLFs) ou dispositivos de liberação local (DLL), para produzir níveis sanguíneos do fármaco muito baixos para produzir atividade antibiótica e, assim, eliminar os efeitos colaterais da administração de antibióticos, mas que ainda produza efeitos inibitórios de MMP e melhora clínica em pacientes com periodontite. A DOX tem propriedades anticolagenolíticas mesmo em dose

subantimicrobial, por este motivo foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos, como agente adjuvante da terapia padrão para o tratamento da PC (GOLUB *et al.* 2008).

### 1.3. Sistema de liberação controlada de doxiciclina em gel

O Actisite® foi um dos primeiros dispositivos de liberação local de TC utilizados em humanos. É um sistema constituído por fibras (copolímeros plásticos, não reabsorvíveis e biologicamente inertes) impregnadas com pó de TC hidrocloreídrica 25%. A fibra é introduzida subgingivalmente até ocupar completamente o interior da bolsa periodontal e mantida *in situ* com o auxílio de um adesivo a base de cianocrilato por 7 a 10 dias (GOODSON *et al.*, 1983). O antibiótico é, então, liberado através do mecanismo de difusão e osmose. Esse sistema de liberação controlada é capaz de manter concentrações de TC no FCG excedendo 1.300 mg/mL por um período de 7 dias, com concentrações médias de 43 mg/mL. A fibra de TC combinada com RAR apresentou resultados significativamente melhores nos parâmetros de PS e ganho clínico de inserção conjuntiva quando comparado ao tratamento em pacientes na terapia periodontal de manutenção (KINANE e RADVAR, 1999). Em lesões de furca classe II associada a SS, Tonetti *et al.*, (1998) observou redução significativa na PS e SS após 3 meses. Jones *et al.*, (2000) publicaram estudo no qual descrevem as características e avaliações clínicas preliminares de um gel de TC hidrocloreídrica (5%) com capacidade de aderir aos tecidos gengivais e a superfície dental, permitindo a liberação lenta da droga no interior da bolsa periodontal. O gel, associado à RAR, promoveu diminuição da PS e reduziu o número de patógenos periodontais no interior da bolsa.

Novos veículos para liberação local de TC têm sido desenvolvidos. Estudos em cultura de células e *in vivo* em animais e em humanos ao longo dos últimos 25 anos, os compostos de TC não antibióticos (DSD e TC Quimicamente Modificada (TQM)) demonstraram efeitos benéficos na perda óssea local e sistêmica. TCs quimicamente modificadas inibem a reabsorção óssea, independentemente se a

perda dos constituintes da matriz orgânica e mineral do osso foi induzida pelo hormônio da paratireóide, prostaglandinas E2, ou endotoxinas. Os antibióticos não TC foram ineficazes neste sistema. Os mecanismos incluíram a capacidade das TCs de inibir MMPs expressas por OBs e OCs. As TCs foram descobertas por aumentar a formação óssea, inibir a reabsorção óssea, por melhorar a atividade dos OBs, da síntese do colágeno tipo I e formação de osso. Em camundongos com osteoporose e com deficiência de estrogênio, como resultado do tratamento com TC, houve o aumento da produção de novo osso e o aumento da conectividade das trabéculas descontínuas reabsorvidas em ossos longos, num modelo de artrite de experimental, estes fármacos aumentaram a biomecânica da força e da resistência óssea à fratura. Tanto a perda óssea alveolar e quanto a sistêmica foram beneficiadas pelos efeitos terapêuticos das TCs (GOLUB *et al.* 2008).

A aprovação de Dose Subantimicrobial de DOX (DSD) ou Baixa Dose de DOX (BDD) pela FDA em Sistemas para Liberação Controlada de Fármacos (SLFs) ou Dispositivos de Liberação Local (DLL) foi baseada na sua capacidade de inibir a atividade das MMPs. As MMPs são responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo periodontal e são induzidas em resposta a uma variedade de citocinas pró-inflamatórias onde as citocinas e quimiocinas desempenham importantes funções na resposta imune (BOSTANCI *et al.*, 2011 EMINGIL *et al.*, 2011).

A periodontite é regulada por uma rede orquestrada de citocinas e quimiocinas. As citocinas são consideradas as principais reguladoras da reação imunitária em diferentes fases da inflamação. A liberação de citocinas está intimamente controlada pelo recrutamento mediado por quimiocinas de células inflamatórias. As quimiocinas facilitam a migração e subsequente ativação de tipos específicos de leucócitos em resposta à infecção bacteriana e podem ser produzidas por múltiplas células, como monócitos ativados e macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. Como uma superfamília complexa de cerca de 40 pequenas proteínas secretoras, distintas, estruturalmente e funcionalmente relacionadas, elas transmitem seus efeitos sobre células-alvo através do reconhecimento por receptores específicos. Essas moléculas desempenham ações em processos inflamatórios e outras atividades fisiológicas e patológicas (EMINGIL *et al.*, 2011).

Houve considerável interesse no papel de quimiocinas em doenças periodontais. A proteína Inibidora de Macrófagos (PIM)-1- $\alpha$  e PIM-1 $\beta$  estão presentes na gengiva inflamada e no FCG, sugerindo um papel na regulação dos eventos inflamatórios locais no periodonto considerando que altos níveis da Proteína Quimioatrativa de Monócitos (PQM)-1 e da proteína RANTES foram detectadas no FCG de pacientes com periodontite, e estes níveis estão correlacionados com a perda de inserção. A modulação e o controle da inflamação são importantes no tratamento de várias doenças inflamatórias, incluindo as doenças periodontais, porque alguns mecanismos inflamatórios protetores demonstram danos se mecanismos contra-regulatórios e endógenos não resolvem suficientemente o processo inflamatório (EMINGIL *et al*, 2011).

A produção de citocinas em resposta às bactérias periodontais inclui uma variedade de tipos de células, sendo que os monócitos são uma das fontes mais importantes dentro dos tecidos gengivais. Os monócitos secretam uma vasta variedade de citocinas, como IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-18 em resposta aos agentes patogênicos periodontais, que desempenham um papel importante na iniciação das respostas imuno-inflamatórias protetoras no periodonto. No entanto, grande liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , pode prejudicar o hospedeiro, por acelerar a inflamação e a destruição do tecido ósseo. Os desequilíbrios na produção de citocinas determinam a extensão da destruição do tecido periodontal nos indivíduos susceptíveis. Um aumento na produção de IL-12 pode ser um evento associado à inibição das citocinas pró-inflamatórias. IL-12 é considerada um elo entre a imunidade inata e adaptativa, e pode ser relacionada na patogênese da periodontite. A produção da citocina anti-inflamatória IL-10 foi aumentada em resposta a DSD, potencializando seus efeitos benéficos para o hospedeiro (BOSTANCI *et al.*, 2011).

Muitos estudos têm mostrado grande elevação de IL-6 em doenças inflamatórias, tais como artrite, diabetes, e periodontite, atribuindo a reabsorção óssea à IL-6, sugerindo que a IL-6 pode ser um útil marcador de diagnóstico da fase aguda inflamação. A DSD levou a uma redução significativa da IL-6 em bolsas profundas o quê confirmou que a ação da DSD foi através da prevenção da reabsorção óssea. Semelhante a IL-6, TNF- $\alpha$ , um potente indutor de IL-6, estimula a

formação de OCs e reabsorção óssea pode atuar sinergicamente com outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , para regular a produção de MMPs. A IL-6 e TNF- $\alpha$ , ambas produzidas principalmente pelos macrófagos, foram significativamente reduzidas em resposta à DSD. Embora não haja evidência de que o RNAm da IL-6 muda nos tecidos com periodontite em comparação com os tecidos com gengivite um estudo demonstrou que a IL-6 e TNF- $\alpha$  podem não ser detectadas no FCG de pacientes com periodontite crônica. Além disso, os níveis de IL-6 no FCG podem não ser um indicador confiável do sucesso da terapia de fase I, pois esta pode resultar em grandes flutuações nos níveis de IL-6 quando não está combinada a DSD, principalmente nas bolsas profundas, o que sugere que a eficácia da instrumentação mecânica poderia ser menor no acesso às superfícies da raiz. Outra explicação pode ser que a atividade osteoclástica seja aumentada em bolsas mais profundas e assim tais bolsas responderiam melhor ao tratamento adjuvante anti-inflamatório. Além disso, há uma redução simultânea no MCP-1, uma quimiocina conhecida por mediar a atividade osteoclástica (EMINGIL *et al*, 2011).

Além da liberação de fagócitos pró-inflamatórios TNF- $\alpha$  e IL-6 a resposta da IL-17 a DSD foi estatisticamente significativa em comparação ao tratamento mecânico sozinho em bolsas de moderadas a profundas. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células-T CD4<sup>+</sup> com atividades biológicas pleiotrópicas sobre diversos tipos de células e uma capacidade de modular a resposta imune ao induzir a expressão de outras citocinas (EMINGIL *et al*, 2011).

A IL-17 medeia eventos que são essenciais para a iniciação de uma resposta inflamatória que leva até a destruição tecidual.<sup>37,38</sup> A IL-17 e TNF- $\alpha$  induzem sinergicamente a produção de IL-6, proporcionando uma ponte entre as citocinas inatas e adaptativas.<sup>36,39</sup> A IL-17 também compartilha as propriedades com a IL-1 e TNF- $\alpha$  e pode afetar tanto a reabsorção óssea mediada por OCs quanto o metabolismo do tecido conjuntivo mediado pela colagenase em condições inflamatórias crônicas.<sup>36,40</sup> A IL-17 mostra-se elevada no FCG de pacientes com periodontite.<sup>41</sup> Os resultados de Emingil *et al.*, (2011) mostraram uma diminuição significativa nos níveis de IL-17 em comparação ao grupo controle, implicando uma atividade dependente das células-T na resolução da inflamação periodontal.

Citocinas anti-inflamatórias estão envolvidos na redução da inflamação. A IL-4 é geralmente secretada a partir de Th<sub>2</sub> e é um potente supressor da função de macrófagos através da inibição de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6,42. A IL-4 pode também regular a função das células B, o crescimento de células T, e expressão de moléculas de adesão de células endoteliais. É uma das poucas citocinas que é um regulador negativo da reabsorção óssea. A ausência de IL-4 nos tecidos periodontais doentes foi associada com atividade e progressão da doença periodontal. A IL-4 pode ativar células do tecido conjuntivo e estimular a acumulação de macromoléculas da matriz extracelular, o que implica sua importância na cicatrização de feridas (EMINGIL *et al*, 2011).

A IL-10 é outra citoquina pleiotrópica que afeta uma grande variedade de tipos de células. é produzido lo por monócitos, macrófagos, e T e Células B e T; inibe a síntese de citocinas pró-inflamatória; suprime a ativação de macrófagos; e limita a duração e extensão da resposta imuno-inflamatória. Os níveis de IL-10 são mais baixos em tecidos gengivais doentes em comparação aos saudáveis. Embora o tratamento mecânico sozinho tenha levado somente a uma diminuição transitória nos níveis destas citocinas, DSD estabilizou os níveis de IL-4 e IL-10 durante 12 meses. Este fato combinado à redução de citocinas pró-inflamatórias, favoreceu os processos de cicatrização e regeneração. A IL-13, que partilha as funções biológicas com a IL-4, está presentes em células mononucleares da gengiva dos pacientes com PC (EMINGIL *et al*, 2011).

A PQM-1 é uma quimioquina conhecida pelo recrutamento específico de macrófagos e monócitos para a área da inflamação. Macrófagos ativos produzem enzimas proteolíticas, como as MMPs, que causam destruição do tecido conjuntivo. Estudos anteriores examinaram a eficácia terapia de DSD em combinação a com terapia periodontal cirúrgica ou não cirúrgica e também mostraram que a terapia de DSD inibe a atividade ou diminuía a expressão de MMP por um mecanismo não relacionado com a eficácia antimicrobiana deste fármaco. Estes achados comprovaram que a redução da atividade colagenolítica pode ser o mecanismo através do qual a terapia DSD inibe a progressão da doença periodontal de forma mais eficaz do que RAR sozinha. Os resultados de Emingil *et al.*, (2011) demonstram que os níveis de PQM-1 no FCG podem ser associados às atividades

colagenolíticas reduzidas devido ao seu impacto na proteólise de MMP da matriz extracelular.

Além de o seu efeito inibidor sobre a atividade de MMP, a DSD também atua como agente anti-inflamatório, exercendo efeitos anti-inflamatórios gerais, que se manifestam com a sua capacidade de inibir a produção e regular a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias) pelos monócitos na presença de Aa. Assim, a DSD pode ter efeitos moduladores sobre a resposta inflamatória através de uma ampla gama de ações. Por exemplo, a inibição de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 pode resultar na diminuição da atividade da reabsorção óssea, enquanto que a inibição de IL-8 pode atenuar o influxo de células inflamatórias nas áreas afetadas. Estas propriedades pode contribuir para os benefícios clinicamente comprovados deste antibiótico como tratamento adjuvante para a periodontite (BOSTANCI *et al.*, 2011).

Resultados anteriores mostram que DSD inibe a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 por macrófagos humanos induzidos por lipopolissacarídeo (LPS) de Aa. Demonstrou-se que a produção de citocinas pró-inflamatórias de células monocíticas THP-1 é reduzida em resposta ao DSD na infecção por *Chlamydia trachomatis*. Pode-se concluir que DSD tem propriedades anti-inflamatórias gerais. A inibição da secreção de citocinas induzidas por bactérias ocorreu de um modo dependente da dose de DOX (BOSTANCI *et al.*, 2011).

Muitos estudos têm demonstrado a eficácia de DSD nas MMP e no metabolismo do colágeno, evitando a progressão da periodontite e prevenindo a perda de osso. A terapia DSD é um meio eficaz na gestão da periodontite através da modulação da resposta do hospedeiro quando usada como um adjuvante para a terapia periodontal não cirúrgica. A terapia adjuvante de DSD promove diminuição significativa nos níveis de MMP no FCG e que estas alterações foram associadas com a melhoria dos parâmetros clínicos periodontais (EMINGIL *et al.*, 2011).

Como afirma Killoy (1998) reduções de PS pode ser importante na decisão da intervenção cirúrgica. Isso pode reduzir o custo e o desconforto da cirurgia para o paciente. A terapia adjuvante DSD pode melhorar os parâmetros clínicos, como significativos ganhos de inserção e redução de PS sobre aqueles conseguidos pela

RAR sozinha, e estas melhorias clínicas são refletidas pelo nível controlado de MMPs em pacientes com PC após a terapia. Semelhante aos resultados de estudos anteriores, no estudo de Tuter *et al.* (2010) houve uma maior diminuição estatisticamente significativa na PS e nos níveis de MMP-8 no FCG favorecendo o grupo DSD adjuvante da RAR ( $P < 0,05$ ). (TUTER *et al.*, 2010).

Os dados de Golub *et al.* (2008) demonstraram que a DSD reduziu significativamente a progressão da perda de inserção periodontal, da gravidade da inflamação gengival e da perda óssea alveolar, sem produzir os efeitos colaterais associados à terapia antibiótica. Os autores concluíram que: 1- a DSD pode reduzir os níveis e da atividade de colagenase ao longo de um prolongado período de tempo 2) os efeitos sobre a colagenase são positivamente correlacionada com um biomarcador de reabsorção óssea e 3) A terapia DSD, em longo prazo, pode produzir esses efeitos nas mulheres que exibem perda óssea local e sistêmica pós-menopausa.

Talvez o efeito mais importante da terapia DSD tenha sido a forte redução na atividade da colagenase nas bolsas periodontais, apoiado por uma redução igualmente importante nos níveis de proteínas do tipo mais predominante de colagenase, MMP-8 (colagenase-2), no FCG (MMP-8=80%, MMP-13=18% e MMP-1= 9%). 20 A redução altamente significativa na MMP-8 durante os 2 anos de DSD refletiu diminuição dos níveis de colagenase leucocitária de 65 a 75 kDa. O ensaio clínico de Golub *et al.* 2008 também demonstrou que o DSD reduziu significativamente a IL-1 $\beta$  (uma citocina pró-inflamatória e de reabsorção óssea) no FCG e a perda de altura óssea alveolar 16 nas mulheres pós-menopausa > 5 anos. Contudo, como descrito anteriormente por Sorsa *et al.* (2006) a inibição completa de MMPs (e não uma redução apenas dos níveis patologicamente excessivos de sua atividade) pode não ser desejável porque estas proteinases neutras têm funções fisiológicas como o processamento de citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas, que são necessárias para a defesa do hospedeiro (GOLUB *et al.*, 2008).

Os marcadores de inflamação sistêmica, como a Proteína C-reativa (PCR) refletiram a suscetibilidade à osteoporose pós-menopausa. A proteína C-reativa é um reagente de fase aguda produzida em resposta a diversos estímulos inflamatórios, incluindo trauma, infecção, calor e hipóxia. Os níveis de PCR

aumentam no soro dentro de 24 a 48 horas após o dano tecidual agudo e diminuem com a resolução da inflamação. A PCR é muito significativa na resposta imune inata e é facilmente medida devido à sua meia-vida plasmática longa. Como consequência de sua cinética, descreve melhor o estado inflamatório do indivíduo. Os níveis séricos elevados de PCR de alta sensibilidade (PCRhs) refletem a inflamação sistêmica e um risco elevado de doença cardiovascular em combinação com outros fatores de risco. Esta proteína de fase aguda também foi reduzida pela DSD em pacientes com doença cardiovascular grave. Estudos demonstraram uma correlação entre periodontite e níveis séricos elevados de PCR. Tuter *et al.* (2007) determinaram que tanto RAR sozinha quanto RAR e administração de DSD reduziram significativamente a PCR em pacientes com PC e doença arterial coronariana em 6 semanas. Os pacientes apresentavam níveis basais de PCR classificados de "alto risco" e ambos os tratamentos reduziram para o de "risco médio" (GOLUB *et al.*, 2008; TUTER *et al.*, 2010).

O objetivo do estudo Tuter *et al.* (2010) foi avaliar a eficácia de administração em curto prazo de DSD quando utilizada como um adjuvante de RAR nos parâmetros clínicos, nos níveis de MMP-8 e -13 no FCG e nos níveis séricos de PCR em pacientes com PC, em estudo de curto prazo. Este estudo demonstrou que a DSD adjunta por apenas 6 semanas resultou em reduções significativas de PS e Índice gengival (IG) acima daquelas alcançadas apenas pela RAR. Além disso, os níveis de MMP-8 do FCG mostraram maior redução pela adição de DSD à RAR do que a RAR + placebo. No entanto, a DSD de curto prazo (6 semanas) associada à RAR não reduz a carga inflamatória sistêmica, como refletida pelos níveis de PCR, dos pacientes com PC. Concluíram que investigações adicionais com um número maior de indivíduos e uma duração maior são necessárias para entender melhor o papel da terapia periodontal com e sem DSD adjunta em pacientes com PC com e sem doenças sistêmicas.

O estudo de Emingil *et al.* (2011) forneceu pela primeira vez, evidências sobre como DSD adjuvante modula mudanças anti-inflamatórias no tratamento da PC. Os resultados mostraram que a DSD suprime citocinas que induzem a produção de MMP. Verificou-se que citocinas pró-inflamatória foram reduzidas e os níveis de citocinas anti-inflamatórias foram estabilizados por DSD no FCG com um efeito

substancial sobre a PQM-1 e PIM-1. Em resumo, estes resultados demonstram que a eficácia do tratamento DSD ocorreu através da modulação de citocinas pró-inflamatórias e da estabilidade das citocinas anti-inflamatórias nos tecidos periodontais. Tal melhora clínica por DSD pode ser atribuída ao impacto da DOX na modulação da resposta do hospedeiro, porque a rede citocina-quimiocina ajuda a entender as alterações celulares inflamatórias e estas proteínas são facilmente detectáveis quando liberadas no meio inflamatório.

O DSD é o único “Food and Drug Administration” aprovado para terapia de modulação da resposta do hospedeiro. Ensaios clínicos provaram a sua eficácia. O impacto clínico da DSD está bem estabelecido e o seu papel na modulação de MMP é bem descrita. No entanto, o seu impacto sobre as citocinas e quimiocinas não estava bem compreendida. Embora várias fontes de quimiocinas possam ser encontradas no periodonto, o epitélio gengival altamente especializado pode ser um produtor, sugerindo que as células-alvo para a retenção de DOX poderiam ser as células epiteliais gengivais. Portanto, a cura mediada por DSD poderia ser uma resolução inflamatória não orientada por macrófagos, que é regulada pelas células epiteliais. Essa hipótese também pode explicar a falta de impacto da DSD na liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e monócitos (EMINGIL *et al*, 2011). No estudo de Emingil *et al*. (2011), foram observadas melhorias clínicas significativas na profundidade de bolsas de moderadas a profundas ao longo de 3 meses de administração de DSD como complemento a RAR. Essas melhorias puderam ser mantidas até ao final do estudo de 12 meses. Estes resultados foram semelhantes a de estudos anteriores, porém em menor tempo (PRESHAW *et al*., 2004). Esses achados sugerem que 3 meses podem ser suficientes para os efeitos benéficos da DOX na modulação da resposta do hospedeiro.

Com o incremento na compreensão da etiologia e patogênese da periodontite e com a mudança de polímeros não biodegradáveis para uma diversidade de polímeros biodegradáveis, foram concebidas várias formas de dosagem e métodos de administração de fármaco. A liberação apropriada de um fármaco, em função da dosagem, é de importância crítica para sua eficácia. A fim de planejar a forma e dosagem mais adequada, vários tipos de materiais carreadores estão sendo desenvolvidos para liberação da quantidade necessária do fármaco no sítio, por um

período prolongado, obtendo eficiência e eficácia. Estes incluem géis, fibras, tiras, películas, microplaquetas, micropartículas, nanopartículas e nanofibras, de baixo preço, maior estabilidade biocompatibilidade, não-imunogenicidade e biodegradabilidade (GARG *et al.*, 2011, GOYAL *et al.*, 2013, JOSHI *et al.*, 2016).

Os géis de administração local são dispositivos semissólidos, biocompatíveis, biodegradáveis e apresentam um comportamento pseudoplástico e termo-responsivo e oferecem inúmeras vantagens. Uma vantagem do gel é a sua “seringabilidade” e facilidade de colocação. Sendo mais fluido, o gel é capaz de ajustar-se à forma e tamanho da bolsa. Um gel pode ser facilmente colocado em bolsas tortuosas ou estreitas ou áreas de difícil acesso, uma vez que pode ser injetado diretamente nestas áreas, onde posteriormente se solidifica e libera o fármaco. São comparativamente fáceis de preparar, administrar e permitem a utilização de pequenas quantidades de fármaco. A formulação em gel não compromete o espaço que deve ser ocupado pelo reparo tecidual e promove um contato íntimo entre o medicamento e a mucosa, propriedade chamada de mucoadesividade ou bioadesividade. Além disso, o risco de irritação ou reações alérgicas no local de aplicação é menor no caso de géis, uma vez que apresentam uma taxa de liberação mais rápida do fármaco, sendo mais livre para difundir através de vias catabólicas normais. Esta constitui uma desvantagem crucial (GARG e GOYAL, 2014, USKOKOVIC, 2015, JEPSEN e JEPSEN, 2016; NEEDLEMAN, 1991; CHADHA e BHAT, 2012).

A DOX é um dos agentes antimicrobianos mais importantes na capacidade de se concentrar no FCG. O FCG apresenta efeito de proteção fisiológica através da lavagem da bolsa e é considerado um excelente meio não disperso (GAMAL *et al.*, 2013). A entrega local de DOX usando transportadores biodegradáveis como tiras acrílicas, fibras, géis, etc mantém uma concentração terapêutica eficaz no FCG da bolsa periodontal (MUNDARGI *et al.*, 2007). Vários estudos clínicos randomizados revelaram a eficácia da administração local de DOX. A aplicação de dispositivos biodegradáveis de liberação sustentada de DOX para nas bolsas periodontais resultou em um significativo ganho de inserção clínica e uma redução significativa em PS. Além disso, dados clínicos demonstraram que a utilização de DOX pode neutralizar parcialmente o efeito negativo do tabagismo sobre a cicatrização periodontal após terapia não cirúrgica (GAMAL *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2004).

O primeiro estudo que demonstrou a efetividade e biocompatibilidade do dispositivo de liberação local de DOX foi o estudo em animais de Polson *et al.* (1996). Estes autores avaliaram o efeito do gel contendo hiclato de doxiciclina a 8,5%, como terapia isolada em periodontite experimental em cães. Foram encontradas reduções médias de 2.5mm para PS 14 e 2mm em ganho de inserção clínica ao final de 4 meses. Este estudo foi o precursor para os estudos clínicos conseguintes. DISSERTAÇÃO BRUNA LIB DOX

Polson *et al.* (1997) realizaram o primeiro estudo clínico em humanos com sistema de liberação local controlada de DOX, (Atridox®) composto por duas seringas: uma delas, contendo o hiclato de DOX a 8,5% e a outra, veículo, contendo 37% de poli-DLlactídeo, dissolvido em 63% de NMP (N-metil-2-pirrolidona). As duas seringas são acopladas e seus conteúdos misturados, de forma a obter-se um gel homogêneo, de coloração amarelada. O gel, em contato com o fluido crevicular, se solidifica e é reabsorvido em um período de 7 a 10 dias. Os autores observaram maior efetividade do gel de DOX quanto à PS e NIC e concluíram que o hiclato de DOX entregue em um sistema de liberação biodegradável é um meio eficaz de reduzir os sinais clínicos da periodontite.

Stoller *et al.* (1998), descreveram as propriedades farmacocinéticas e estudaram as concentrações encontradas no FCG, após aplicação local de um sistema entrega de liberação controlada biodegradável contendo Hiclato de Doxiciclina (HD) a 8,5% (Atridox). Os componentes do sistema estavam contidos duas seringas separadas que são misturados imediatamente antes da utilização. Uma seringa continha HD e a outra um polímero dissolvido num veículo biocompatível. Quando a HD foi injetada na bolsa periodontal, o polímero voltou ao seu estado sólido. À medida que o polímero degrada, a DOX foi lançada no ambiente da bolsa. Os autores encontraram uma concentração de 1493 µg/ml (700 vezes maior que a MIC) no fluido crevicular em 2 horas. Esta concentração permanecia alta (acima de 1000 µg/ml) após 18 horas, e caía para 309 µg/ml ao sétimo dia, sendo esta última concentração ainda 150 vezes maior que a MIC. A concentração mais alta deste medicamento encontrada na saliva foi de 8,78 µg/ml em 2 horas e caiu para menos de 2 µg/ml ao final do dia. As concentrações séricas não excederam 0,1 µg/ml.

O sistema de liberação da DOX, para distribuição dentro da bolsa periodontal, foi desenvolvido com DOX a 1 % por Killooy (1999). Entretanto, estudos têm mostrado que o uso do gel de DOX a 10% foi benéfico em muitos casos clínicos. A concentração de DOX, na bolsa periodontal, foi superior à mínima concentração inibitória (MIC) (6 µg/mL) até 28 dias. O polímero de DOX gel oferece antibiótico 10-100 vezes mais elevado que o MIC, com duração suficiente para afetar a microbiota periodontal. O gel de DOX 10% associado à RAR mostrou-se mais efetivo na redução da PS e melhora do NIC no tratamento da periodontite crônica de moderada à grave (GUPTA *et al.*, 2008, MOURA *et al.*, 2015). Mendes *et al.* (2010) tiveram redução de até bolsas 7 a 8 mm até 4 mm de profundidade, com ganho de inserção tecidual, melhorando substancialmente a qualidade de vida de indivíduos portadores de doenças periodontais. Estes estudos obtiveram êxito nos casos em que os dentes seriam extraídos.

Comparando a liberação local de DOX com a RAR, Garrett *et al.* (1999), em estudo multi-cêntrico, verificaram que o gel de DOX, aplicado isoladamente, apresentou resultados similares à terapia mecânica e higiene oral, quanto aos ganhos em PS e NIC. Estes resultados seguiram um acompanhamento de nove meses. A aplicação do gel e a instrumentação periodontal foram feitas inicialmente e após 4 meses. Em estudo subsequente Garrett *et al.* (2000) verificaram a ação do gel de DOX em pacientes sob terapia de manutenção. O mesmo protocolo do estudo de 1999 foi utilizado. Os resultados demonstraram que a monoterapia com o gel de DOX foi novamente similar à terapia mecânica por nove meses.

Wennstrom *et al.* (2001), em estudo multi-cêntrico, avaliaram a ação da terapia local com DOX associada à RAR ou associada ao debridamento mecânico por meio de ultra-som. Estes autores encontraram reduções nos parâmetros clínicos significativamente maiores para o grupo debridamento + DOX aos 3 meses e maior redução de SS aos 6 meses. Os autores concluíram que a forma simplificada de tratamento mecânico (debridamento com ultra-som) associada à terapia local com DOX pode ser considerada uma abordagem terapêutica mais prática, já que o tempo clínico para a conclusão da mesma é menor.

Garrett *et al.*, (1999), Wennstrom *et al.*, (2001) e Eickholz *et al.*, (2002), compararam os resultados clínicos obtidos com RAR e DOX entregue localmente e

concluíram que a DOX subgingival é um complemento útil à terapia mecânica não-cirúrgica da PC.

Salvi *et al.* (2002) realizaram estudo clínico com o objetivo de avaliar clínica e microbiologicamente o efeito de três dispositivos de liberação controlada após terapia periodontal inicial: Atridox®, Elyzol® e PerioChip® em 47 pacientes por 18 semanas. Os resultados indicaram ganho significativo do nível de inserção clínica para Atridox® e diminuição da PS para os três dispositivos.

Em dois ensaios clínicos multicêntricos concebidos para estudar a eficácia do sistema local contendo DOX, a redução da PS foi de 1,3 mm e ganho de inserção clínica de 0,8 mm foram obtidos no mês 9. Em ambos os estudos a DOX foi injetada em bolsas  $\geq 5$  mm, as quais sangraram mediante sondagem, no início. Foram observados que os níveis de DOX foram suficientemente elevados para modificar a flora microbiana e para a melhora acentuada das condições clínicas. Assim, o gel biodegradável de DOX a 14% pôde ser classificado como um dispositivo de liberação controlada. O efeito antibiótico foi limitado principalmente aos locais de aplicação do gel. O gel possuiu propriedades farmacocinéticas para proporcionar níveis clínicos eficazes de DOX para a bolsa periodontal e para manter estes níveis durante pelo menos uma semana sem a necessidade de proporcionar ainda mais retenção do fármaco pelo uso de um curativo periodontal (KIM *et al.*, 2002)

Jorgensen *et al.* (2004) avaliaram a capacidade do gel de DOX a 10% (Atridox®) de suprimir bactérias periodontopatogênicas subgingivais após a RAR. Quinze pacientes portadores de periodontite moderada e avançada com BP de 6 – 7 mm receberam duas formas de tratamento: RAR e DOX (Atridox®) associada a RAR. Os resultados mostraram que o dispositivo de liberação controlada de DOX associado à RAR não causou significativa redução da microbiota patogênica subgingival quando comparada à RAR. Em outro estudo clínico realizado em 2004, Akalin *et al.* compararam a eficácia clínica da utilização de DOX sistêmica (DS) e local (DL) no tratamento da periodontite crônica. Quarenta e cinco pacientes foram divididos em três grupos com cinco tratamentos: DS, RAR e DS, DL, RAR e DL, RAR. Ao final de sete semanas os autores observaram que o tratamento realizado apenas com DL pareceu ser mais efetivo na redução da PS que o tratamento realizado apenas com DS. Entretanto não foram encontradas diferenças

estatisticamente significantes entre as duas terapias associadas à RAR. O uso local de DOX parece ser preferível ao sistêmico, uma vez que se mostrou mais efetivo na redução da PS e não apresentou efeitos colaterais.

Eickholz *et al.* (2005) avaliaram os efeitos clínicos da aplicação local de gel de DOX a 15% como adjunto a terapia periodontal não-cirúrgica em 111 pacientes portadores de periodontite moderada e severa. Em cada paciente foram realizadas três modalidades de tratamento: RAR, RAR associada a um gel controle (VEH) e RAR associada a aplicação de um gel de DOX a 15%. Ao final do estudo os autores observaram que a utilização de gel de DOX a 15% como adjunto a RAR promoveu aumento do nível de inserção e diminuiu a PS.

Pappalardo *et al.* (2006) realizaram estudo com objetivo de avaliar os resultados clínicos e microbiológicos promovidos pela liberação local de antimicrobianos no tratamento da periodontite. Trinta e três indivíduos, portadores de PC foram selecionados para este estudo. Onze pacientes receberam aplicação local de gel de DOX (10%), 11 receberam aplicação de gel de clorexedina (1,5%) e 11 receberam apenas RAR. Os pacientes que receberam DOX apresentaram redução da perda de inserção e redução da PS de 1,4mm; os pacientes que receberam clorexedina apresentaram redução da perda de inserção e redução da PS de 0,9mm e os pacientes que receberam RAR apresentaram índices de redução menores que os demais grupos. Os resultados sugerem que a liberação local de antimicrobianos pode promover benefícios adicionais à terapia mecânica. A associação de RAR e gel de DOX (10%) apresentou os melhores resultados. Takahashi *et al.* (2006) avaliaram, por meio da MIC, os efeitos da TC, minociclina, DOX e ofloxacina, administrados por via local e sistêmica em biofilmes de *Prevotella intermedia* (bactéria gram-negativa, anaeróbica e periodontopatogênica). Os resultados indicaram que apenas a DOX apresentou atividade inibitória a MIC.

Mundargi *et al.* (2007) em estudo de eficácia de liberação *in vitro* indicou a liberação de DOX de 7 a 11 dias. Até 11 dias, as concentrações de DOX no FCG foram maiores do que a MIC da DOX contra a maioria dos patógenos periodontais. Foram obtidos resultados significativos em trinta sítios de bolsas periodontais em relação aos parâmetros microbiológicos e clínicos até 3 meses, em comparação ao gel de DOX comercial. Os pacientes demonstraram melhorias nos parâmetros

clínicos chaves PS e NIC que podem continuar a melhorar ao longo de um período de mais de 6 meses. Isto foi atribuído ao constante reforço da instrução de higiene oral em cada visita e ao Efeito Hawthorne. A remoção repetida de organismos do biofilme supragengival pode ter afetado diretamente as células bacterianas e alterado a ecologia do biofilme subgengival adjacente e do estado inflamatório nos tecidos gengivais locais. Esta redução da inflamação seria acompanhada por uma diminuição do fluxo do FCG e, portanto, uma diminuição no crescimento da placa. Mundargi *et al.* (2007) notaram uma redução significativa na PS na primeira avaliação, após 1 mês, isso pode ser atribuído a uma redução na inflamação gengival, como relatado por Reynolds *et al.* em 1992. Um conjunto de parâmetros com um valor preditivo estabelecido nos permite fazer uma previsão mais realista ao paciente sobre o resultado do tratamento (MUNDARGI *et al.*, 2007)

No estudo de Ioannou *et al.* (2010) participaram 33 indivíduos com PC, divididos em dois grupos RAR e RAR associada à aplicação tópica do gel de DOX a 8,8% aplicada no tempo inicial e após 3 meses em sítios pré-selecionados. A melhora foi mais acentuada nas bolsas moderadas e profundas. Nas bolsas profundas foi observada uma redução estatisticamente significativa na PS entre 3 e 6 meses. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Isto poderia ser explicado pelo fato do fármaco teste ter sido aplicado apenas a 4 bolsas pré-selecionadas e, por conseguinte, seria muito difícil proporcionar um benefício clínico verdadeiro. Geralmente uma redução de PS de 1 - 1,5 mm em bolsas moderadas (4 - 6 mm) e de 2 - 2,5 mm nas mais profundas é esperada após a instrumentação mecânica da raiz. Isso ocorre concomitantemente com um ganho de NIC de aproximadamente 0,5 mm e 1,5 mm nas bolsas moderada e profunda, respectivamente. Qualquer redução adicional da bolsa ou ganho de NIC, após a administração do fármaco, representaria um verdadeiro benefício clínico e, portanto, pode reduzir a necessidade de cirurgia periodontal adicional (IOANNOU *et al.*, 2010).

No estudo de Sandhya *et al.* (2011) com Hiclato de DOX a 10% (Atridox®, Tolmar, Ft. Collins, CO, EUA) houve uma redução significativa no índice de placa, da PS e do número de colônias anaeróbias em todos os intervalos de tempo. Isso pode ser devido a quantidade do fármaco presente no FCG (POLSON *et al.*, 1997;

STROLLER *et al.*, 1998). O índice de placa mostrou uma redução significativamente no intervalo de 3 meses. Observações semelhantes foram observadas por estudos anteriores (POLSON *et al.*, 1997, TOMASI *et al.*, 2004). Isso pode ser atribuído às instruções de higiene oral ou fenômenos de Hawthorne (JEFFCOAT, 1992; POLSON *et al.*, 1997). Sandhya *et al.* (2011) encontraram também uma redução significativamente maior na PS ( $P < 0,001$ ) e no ganho de NIC ( $P < 0,001$ ) no final de 3 meses. Outros estudos descreveram resultados comparáveis (WENNSTROM *et al.*, 2001, TOMASI *et al.*, 2004). Os efeitos antimicrobianos da DOX contribuem positivamente para a melhoria da cicatrização (STROLLER *et al.*, 1998). Resultados também sugerem que a DOX modula a resposta do hospedeiro inibindo a produção e eliminando as espécies reativas de oxigênio geradas por PMN, inibindo assim a destruição do tecido conjuntivo durante a periodontite. É muito provável que a DOX iniba as proteases bloqueando a conversão de proteases latentes em formas maduras ativas por meio da quelação de íons metálicos (LEE *et al.*, 2004).

Assim, estas propriedades não-antimicrobianas podem oferecer uma explicação adicional, que poderia ter contribuído positivamente para a melhoria das bolsas. Esta maior redução é principalmente porque a RAR promove uma desorganização do biofilme subgingival e após a RAR é realizada a liberação do fármaco. Assim, ao reduzir a carga microbiana inerente, o fármaco age com maior eficácia favorecendo o tratamento não-cirúrgico. Contudo, pode também ser fundamentado que as células planctônicas remanescentes possam se reorganizar novamente em um biofilme. A utilização de DOX local acompanhada RAR pode ter sido capaz de eliminar ou reduzir as células planctônicas, evitando assim a recolonização. A utilização de DOX em bolsas profundas, habitat favorável dos periodontopatógenos e onde há maior prevalência da desagregação dos tecidos periodontais, pode ter inibido a recolonização de bactérias nesses locais (SANDHYA *et al.*, 2011).

Chadha e Bhat (2012) concluíram que a terapia mecânica não-cirúrgica de RAR resulta em mudanças significativas na PS. O uso adicional de entrega local de DOX através da forma de gel aumenta ainda mais as mudanças positivas obtidas na sequência da RAR. A liberação de DOX a partir do gel liberou o fármaco acima da

MIC necessária. Portanto, DOX entregue localmente pode ser utilizada no tratamento da PC.

No entanto, vários estudos têm relatado melhorias limitadas dos registros de NIC e PS ao comparar o protocolo de tratamento combinado (RAR mais antimicrobianos localmente administrados) ao tratamento mecânico sozinho. Estes sistemas apresentam deficiências, incluindo a penetração inadequada ou imprevisível do fármaco na bolsa periodontal, mas a falta de retenção dos fármacos na bolsa periodontal é provavelmente a principal razão para resultados controversos. Uma das limitações mais importantes dos veículos de entrega local é a liberação rápida e total do fármaco da bolsa resultando num tempo inadequado de exposição das bactérias subgingivais ao fármaco. Em curto prazo (poucos dias) ou limitado (percentagens do total da liberação) do antibiótico incorporado pode não garantir efeitos antibacterianos, poderia estimular a resistência ao antibiótico. Uma explicação também pode ser a baixa frequência de administração, quando apenas uma aplicação de gel é utilizada. E outra explicação poderia ser as baixas doses ou concentrações em relação à concentração inibitória mínima (CIM) ou concentração bactericida mínima (CBM), descrita num estudo *in vitro* (IOANNOU *et al.*, 2010). Significa que os efeitos bactericidas e bacteriostáticos sobre microorganismos do biofilme subgingival e da substantividade podem não ser alcançados no ambiente subgingival (VINHOLIS *et al.*, 2001). No caso de matrizes não degradáveis, a necessidade de cirurgia para a remoção pode conduzir a uma outra infecção e respostas inflamatórias indesejáveis às matrizes utilizadas ou subprodutos da degradação. Além desta, volume ocupado pelo veículo de entrega ou a sua degradação em produtos ácidos que poderiam interferir na reparação tecidual. Além disso, os materiais implantados poderiam ser uma superfície ideal para o restabelecimento as bactérias formadoras do biofilme original ou para iniciar uma infecção por um novo tipo de bactéria (Gamal *et al.*, 2013; IOANNOU *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2016).

Um fator importante para a reparação periodontal é eliminar ou reduzir as chances de infecção pós-operatória e contaminação do coágulo de sangue e do biomaterial implantado. A infecção inevitavelmente prejudicaria a cicatrização. Neste sentido, a entrega local de antimicrobianos durante as fases iniciais de reparação pode promover o selamento do sítio-alvo, fator que poderia melhorar a proteção e o

processo de reparo periodontal (GAMAL *et al.* 2013). De acordo com Jain *et al.* (2008) a entrega prolongada e sustentada de agentes anti-bacterianos pode evitar a recolonização, após RAR, de agentes patogênicos por um longo período e redução significativa nos parâmetros clínicos periodontais na PC em comparação a terapia padrão.

Um outro fator importante a ser considerado no tratamento com fármacos locais é o tempo e a frequência de contato deste com a microbiota subgengival. Logo, a liberação do fármaco necessita ser controlada e sustentada para que o princípio ativo possa permanecer pelo período necessário. Em um estudo de Jolkovsky *et al.* (1990), a importância da periodicidade da técnica adjuvante foi demonstrada porque a renovação constante do fluido facilita a saída das substâncias da área subgengival. Oh *et al.* (2016) em estudo sobre o tratamento da osteomielite, uma liberação sustentada de antibiótico desenvolvida por um período de tempo suficiente (mais do que um mês) sem qualquer matriz adicional e de cirurgia para remoção da matriz não-degradável e livre de respostas adversas à matriz pode ser um agente terapêutico promissor para o tratamento de osteomielite. Portanto, para a efetiva atividade de um fármaco aplicado localmente, é necessário um sistema de liberação lenta que permaneça por um adequado período de tempo e proporcione concentrações acima da concentração inibitória mínima, para a inativação dos periodontopatógenos (JOLKOVSKY *et al.*, 1990; SOSKOLNE, 1997).

Goodson (1989) demonstrou que numa bolsa periodontal, de aproximadamente 5 mm de profundidade, a taxa de renovação do FCG na bolsa periodontal está aumentada, cerca de 40 vezes por hora, devido ao processo inflamatório. Este autor estimou que a meia vida de um agente farmacológico no sulco gengival é de aproximadamente 1 minuto. Oosterwaal *et al.* (1990) demonstraram que a meia-vida de um gel de fluoresceína depositado em uma bolsa periodontal foi de 12,5 min devido ao fluxo do FCG. Segundo Mombelli e Samaranayake (2004), o aumento da taxa de renovação do FCG em bolsas periodontais favorece a difusão mais rápida do fármaco dos géis, a menos que eles se tornem mais viscosos e menos susceptíveis à hidrólise. A taxa de liberação não é apenas determinada pela concentração local do fármaco, mas também pela velocidade de degradação e pelas propriedades de barreira do veículo do fármaco

(KiM *et al.*, 2002). Dispositivos de liberação viscosos e biodegradáveis apresentaram uma redução exponencial da concentração do antimicrobiano no fluido gengival (GIANELLI *et al.*, 2008). Maximizar a bioadesividade continua ser objetivo importante no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (PATTNAIK *et al.*, 2007).

KiM *et al.* (2002) observaram que um sistema de entrega local de DOX a 14% manteve níveis médios de DOX dentro do FCG acima de 16 µg / mL durante 12 dias. KiM *et al.* (2004) em um estudo comparando um gel de Atridox (8,5%) e um gel de DOX a 14% em defeitos periodontais contralaterais de tamanho e forma semelhantes, observaram que no momento da aplicação foi administrado substancialmente mais gel de ATRI (88mg) do que o gel de DOX, (27mg), este fato pode ser explicado pela viscosidade consideravelmente mais baixa do gel de ATRI em comparação ao gel de DOX. Os autores relataram também que a concentração de DOX foi maior do que o MIC<sub>50</sub> para Aa em biofilmes por um período de 10 dias. E concluíram que uma dose única de gel de DOX forneceu atividade antimicrobiana suficiente para 10 dias e preenche as condições para um dispositivo de liberação controlada. O efeito antibiótico foi limitado principalmente aos locais subgengivais de aplicação do gel de DOX. O gel possui propriedades farmacocinéticas e clínicas para proporcionar níveis eficazes de antibióticos para a BP e para manter estes níveis durante pelo menos uma semana sem a necessidade de ter ainda mais retenção do fármaco através de um curativo periodontal. Houve uma produção decrescente de FCG, que por si só é um indicador clínico da redução da inflamação.

Shang *et al.* (2008) mostraram que a imobilização do fármaco por copolimerização é eficaz na diminuição da sua taxa de liberação. Outro estudo realizado por Liu *et al.* (2005) mostrou que a difusão das moléculas de fármaco imobilizada em géis é afetada pela densidade da rede do gel. Em um gel de baixa porosidade é esperada liberação mais prolongada do fármaco (OBAIDAT *et al.*, 2009).

Estudos relataram que a exposição direta da superfície radicular à TC pode reduzir a adesão das células do ligamento periodontal na superfície radicular. O revestimento direto da DOX na superfície da raiz pode reduzir os fibroblastos do ligamento periodontal e a viabilidade e adesão de coágulos. A TC pode ser retida dentro dos túbulos e continuar sua ação desmineralizadora. Em vista disso, expor a

DOX, indiretamente, à superfície da raiz por meio de um dispositivo de dupla entrega pode evitar a criação de um efeito “smearlike” do gel de DOX sobre a superfície da raiz, produzindo uma morfologia superficial semelhante à da camada de “smear” (lama de esfregaço) com baixa retenção de coágulo de fibrina e anulando os efeitos positivo dos túbulos dentinários expostos, da dentina intertubular e do colágeno associado à dentina, que aumentam a quantidade de áreas de superfície da raiz nas quais o gel pode ser anexado, aumentando sua mucoadesividade, aumentando a adsorção e sustentividade da DOX e, por conseguinte, aumentando sua concentração local, prolongando a liberação da DOX do disposto e por fim, aumentar essa disponibilidade da DOX no FCG sem interferir nas características da superfície da raiz. Esta dupla entrega fornece uma prevenção da recolonização bioquímica do biofilme. Ao mesmo tempo em que evita o prolongamento da ação desminarizadora da DOX, do manchamento da raiz e todos esses fatores favorecem o processo de reparo tecidual do ligamento periodontal (GAMAL *et al.*, 2013).

O principal objetivo do trabalho de Gamal *et al.* (2013) era quantificar níveis de DOX durante os estágios iniciais de reparo para discernir se tal melhora clínica poderia ser atribuída a níveis prolongados e aumentados de DOX. Os resultados sugeriram que o regime antibacteriano DOX- $\beta$ -TCP + EDTA é um conveniente método de obtenção de uma liberação prolongada do fármaco levando em consideração o custo-benefício, sem causar manchas na superfície radicular pelo gel de DOX, sem comprometer o espaço que deve ser ocupado pela regeneração tecidual por um dispositivo de entrega, diminuindo a possibilidade de contaminação bacteriana e de liberação de produtos de degradação tóxicos, em conjunto com a proteção mecânica sugerida efeito dos túbulos dentinários expostos à DOX- $\beta$ -TCP + EDTA. Os autores concluíram que quando utilizado como um adjuvante da RAR para o tratamento da periodontite, DSD resulta em melhorias estatisticamente e clinicamente significativas sobre as obtidas pela RAR sozinha.

Os DLL têm se mostrado mais biocompatíveis, quando associados a carreadores (LANGER e PEPPAS, 2003). Os principais sistemas transportadores usados são: as macromoléculas (albumina, anticorpos monoclonais, ciclodextrinas, dextrano, glicoproteínas), as células (eritrócitos, linfócitos) e as vesículas (liposomas, nanocápsulas, nanoesferas, sistemas de emulsão múltiplos). Eles têm sido utilizados a fim de avaliar diferentes formas de dosagem, visando à proteção do princípio ativo,

evitando a decomposição físico-química e a dissolução precoce das moléculas de antibióticos, e atenuando os efeitos colaterais dos fármacos (JENNING *et al.*, 2000; NICKLES *et al.*, 2017).

A hipótese levantada na pesquisa é que o duplo encapsulamento da DOX, no polímero do gel e no composto de inclusão com  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD/DOX), como um veículo de liberação indireta, possa aumentar a permanência do gel e sua mucoadesividade, contato entre o medicamento e a mucosa, melhorar a disponibilidade da DOX e prolongar a ação do princípio ativo no FCG após a sua liberação da  $\beta$ -CD, transportador direto do fármaco. O objetivo é aumentar a concentração local de DOX, por um regime de não ocupação do espaço, a fim de não interferir na adesão das células do ligamento periodontal. Fator que pode manter e melhorar significativamente a substantividade da DOX, aderência à superfície da raiz. Além disso, que a beta-ciclodextrina expondo indiretamente a DOX possa evitar manchamento da superfície radicular, diminua a hidrossolubilidade da DOX, a proteja da decomposição físico-química, prolongando os efeitos terapêuticos da DOX, anti-inflamatórios e osteogênicos, associados à redução da resposta inflamatória (JEERVOE-STORM *et al.*, 1996, IOANNOU *et al.*, 2010, NICKLES *et al.*, 2017) e conseqüentemente, promova aumento da densidade óssea e a melhora dos parâmetros clínicos da PC obtidos após RAR. O gel proposto neste estudo não foi previamente relatado na literatura.

O composto de inclusão DOX /  $\beta$ CD apresenta potencial aplicação para o controle químico do biofilme bacteriano e na neoformação óssea, em doses mais baixas que aquelas já usadas com a DOX pura. O estudo de Suárez *et al.*, (2014) comprovou, através de perfis termodinâmicos, a aderência da DOX à membrana do *S. aureus*. A propriedade lipossolúvel da DOX facilitaria a difusão do fármaco através da membrana celular dos microrganismos. Além disso, a aderência também da  $\beta$ CD à membrana aumenta o gradiente de concentração do fármaco e o fluxo de absorção celular, sugerindo um efeito sinérgico que explica a maior atividade de DOX /  $\beta$ CD contra *S. aureus* em comparação com a DOX pura. O tratamento de *S. aureus* com concentrações mais altas de DOX / BCD resultou em uma diminuição exponencial do tamanho das células de *S. aureus*, da sua neutralização e, por fim provocando sua lise. A inclusão de DOX em  $\beta$ CD apresentou menor citotoxicidade e favoreceu de forma significativa a proliferação de osteoblastos e todos os

parâmetros da osteogênese analisados em comparação com a DOX livre, corroborado por Trajano *et al.* (2016).

Resultados microbiológicos da atividade dos compostos de inclusão de clorexidina-beta-ciclodextrina, mostraram ser quatro vezes mais efetivos que os fármacos correspondentes livres (PATARO *et al.*, 2003, DINIZ, 2007). Dessa maneira, sistemas de liberação lenta de DOX diminuiriam os efeitos colaterais das TCs via sistêmica, tais como o manchamento dental, a descamação de mucosa bucal, perda temporária do paladar e o sabor desagradável (CORTÉS *et al.*, 2001).

Oh *et al.* (2016) mostraram uma liberação prolongada de DOX em um composto íon-complexado (icDX: DX e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) durante 6 semanas (período essencial para tratar a osteomielite). Enquanto a DOX livre, com caráter solúvel em água, teve uma liberação inicial muito maior e a dissolução ocorreu dentro de 1 dia. A partir dos resultados da citotoxicidade e da atividade antibacteriana, foi reconhecido que 10 mg / mL de icDX pode efetivamente inibir o crescimento de *S. aureus* por período suficiente para tratar a osteomielite, sem citotoxicidade. Como esperado, o icDX com uma concentração mais elevada de DOX mostrou uma zona de inibição (ZOI) maior do que a menor concentração, indicando uma maior atividade anti-bacteriana. A compatibilidade celular do icDX foi melhor se comparada a DOX livre com a mesma concentração, devido à liberação lenta da DOX do icDX. O baixo efeito antibacteriano da DOX livre não evitou o crescimento de *S. aureus* por período suficiente para inibir o desenvolvimento da osteomielite e pode ser entendido pela rápida liberação, devido ao caráter solúvel da DOX em água, antes que a bactéria fosse erradicada da cavidade medular do fêmur. Esta é a principal razão pela qual o uso do antibiótico em si é proibido como um sistema de entrega local para tratar doenças infecciosas no organismo. A dissociação total de icDX sem quaisquer subprodutos em solução aquosa (PBS ou fluido corporal) pode ser uma vantagem para evitar infecções por uma segunda cirurgia para remover a matriz antibiótica ou inflamatória ou para evitar respostas indesejáveis aos subprodutos da degradação da própria matriz usada. O lançamento contínuo do DOX do icDX, que pode fornecer atividade anti-bacteriana prolongada, pode ser útil para suprimir o crescimento bacteriano e efetivamente tratar a osteomielite, um desafio da prática clínica. O tratamento eficaz da osteomielite com o uso de icDX, *in vitro* e em *in vivo*, pode ser entendida pela liberação sustentada de

DOX a partir do iCDX e pela manutenção estável das concentrações terapêuticas locais do antibiótico por período suficiente no local da doença (cerca de 6 semanas), o que não pode ser conseguida por terapias via oral ou parentérica.

Géis carregados com dosagem baixa de antibióticos estão ganhando mais atenção no tratamento da periodontite. Nestes géis, o fármaco não apresenta ação bactericida devido à baixa dose, mas a resposta inflamatória à infecção é alterada. Nas condições periodontais, há uma produção excessiva de colagenase causando danos aos tecidos saudáveis. Doses baixas de antibióticos suprimem a produção excessiva desta enzima. Foi previamente mostrado que a DOX, em doses mínimas e em regimes de liberação regulares, mostrou-se eficiente na redução da perda óssea alveolar em pacientes com PC, por inibição da atividade da colagenase no FCG, sem desenvolver resistência antibiótica, sendo considerada o inibidor mais potente das MMPs. A FDA aprovou o uso clínico da DOX em baixa dose ou subantimicrobial para o tratamento da PC adjunto a RAR. Estudos clínicos foram realizados avaliando a ação antimicrobiana local de doses subterapêuticas de DOX, associada à RAR no tratamento periodontal, mostrando-se mais efetivo se comparado aos procedimentos mecânicos sozinhos. Ressalta-se ainda que o período de exposição a estas doses pode ser maior, e que diminui a probabilidade de resistência bacteriana e seus efeitos (REDDY *et al.*, 2003, GARG *et al.*, 2011, KHANDAN *et al.*, 2015).

Uma preocupação no uso de antimicrobianos no tratamento da PC é o risco de surgimento de espécies resistentes aos antibióticos (IOANNOU *et al.*, 2010). Espécies com resistência intrínseca à TC: *Streptococcus spp.*, *Veillonella Parvula*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Gemella morbillorum*, *Actinomyces*, *Actinobacillus (Aa)* *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* e *Eubacterium* devido à presença de determinantes tet (TC) (genes tet.). Espécies como *Bacteroides* e *Prevotella* podem adquirir facilmente resistência à TC e podem servir como indicadores do desenvolvimento de resistência aos antibióticos após terapia periodontal. Estudos indicam também que a exposição a concentrações subinibitórias de TC, por períodos mais longos, representa um maior risco de desenvolvimento e persistência de bactérias resistentes (RODRIGUES *et al.*, 2004). Segundo Larsen e Fiehn (1997) microrganismos associados à periodontite podem desenvolver resistência após exposição a concentrações subterapêuticas de

antibióticos. E segundo Gamal *et al.* (2013) níveis subterapêuticos de DOX de forma prolongada (acima de 21 dias) podem aumentar o risco de bactérias desenvolvendo resistência a DOX.

No entanto, Slots e Rams (1990) informaram que o MIC em que Pg, Pi, *Campylobacter rectus*, e Fn são suscetíveis a DOX é uma concentração  $\leq 6,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Larsen (1990) também relataram que DOX é eficaz contra patógenos periodontais em uma concentração de 0,1 a 6,0  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e Mombelli e van Winkelhoff (2001) relataram que varia de 0,1 a 2,0  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . A maioria dos microorganismos subgengivais são suscetíveis a espécies como *Eikenella corrodens*, *Prevotella oralis* e *Selenomonas sputigena*, enquanto algumas cepas de *Campylobacter* e *Veillonella* é suscetível à MIC de  $\geq 16 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Uma bactéria periodontal que tem um MIC de 16-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  é considerada resistente por administração oral. Estudos em biofilme subgengival humano mostraram que a DOX a 125  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pode inibir uma média de 99% das bactérias. Foi relatado em 250  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de 10% de DOX no FCG durante um período de 7 dias e 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ao final de 10 dias (Polson *et al.*, 1996).

Gamal *et al.* (2013) em 21 dias, encontraram um valor médio de 194,7  $\mu\text{g} / \text{mL}$  no FCG tratado com DOX subterapêutica. Após a administração de um polímero de DOX (BOGREN *et al.*, 2008), os níveis de DOX no FCG foram 500-1000 vezes maiores que os atingidos por via oral. Portanto, é pouco provável que as bactérias resistentes a 16-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  possam sobreviver a estes níveis tão elevados atingidos pela entrega sítio-específica (RODRIGUES *et al.*, 2004). Isto significa que, ainda que em dose subterapêutica, a DOX liberada localmente atinge alta concentração passando de uma ação bacteriostática a bactericida (GOREN *et al.*, 2008). O estudo de Walker *et al.* (2000) concluiu que o tratamento com DOX de liberação sustentada aplicada localmente não resultou na alteração do número real de bactérias resistentes ou na aquisição de resistência aos antibióticos. Bogren *et al.* (2008), descobriram que bactérias resistentes a DOX (*estreptococos*, *Bifidobacterium*, *Clostridium malenominatum*, *Campylobacter concisus*, *Fusobacterium prausnitzii*) fazem parte da microbiota normal antes do tratamento. O uso em longo prazo de Dose Subantimicrobial de DOX (DSD) não está associado com o desenvolvimento da resistência aos antibióticos na microflora do hospedeiro (IOANNOU *et al.*, 2010).

Rosling *et al.* (2001) realizaram estudo longitudinal em 223 indivíduos portadores de periodontite com o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação tópica como adjunto no tratamento periodontal não cirúrgico e na terapia periodontal de suporte. Todos os pacientes foram submetidos à terapia não-cirúrgica. Os pacientes foram submetidos de 3 a 13 anos de terapia de periodontal de suporte. Embora tenha sido constatada melhora nos pacientes do grupo teste, muitos indivíduos apresentaram recorrência da doença. Para explicar tal recorrência os autores sugerem algumas razões como controle de placa não-adequado, neoformação de biofilme subgengival e incompleta remoção da microbiota subgengival durante a fase inicial de tratamento.

A liberação de DOX ocorreu em 2 h tanto no FCG quanto na saliva. A eficácia clínica nos locais de controle e de teste foi definida como uma concentração maior do que a MIC<sub>50</sub> para Aa em biofilmes. Dentro dos primeiros 2 dias após a aplicação, as amostras de FCG obtidas a partir de controle locais, exibiram concentrações de DOX que podem ser consideradas clinicamente eficazes. Nas amostras de FCG dos locais de teste, a concentração de DOX foi maior do que o MIC<sub>50</sub> para Aa por um período de 10 dias após a aplicação de ambos os géis de DOX (EICK *et al.* 2002).

Um achado interessante observado no estudo de Rodrigues *et al.* (2004) foi a alta prevalência de sítios com patógenos tetraciclina-resistentes incluindo Aa, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* antes da terapia antibiótica. A pesquisa avaliou as mudanças nos padrões de resistência à TC da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite tratados com TC local e sistêmica mais a terapia de RAR ao longo de um período de 1 ano. Uma diminuição na frequência de sítios apresentando espécies patogênicas resistentes (Aa, *P. gingivalis* e *T. forsythensis*) à TC foi notada 1 ano após tratamento, porém foi significativa em ambos grupos de TC sendo mais significativa nos indivíduos tratados com TC local, caindo para níveis basais ao longo do tempo. A terapia sistêmica de TC apresentou a maior proporção destas espécies, um ano após o tratamento. Um aumento significativo foi notado aos 3 meses, provavelmente devido a seleção e crescimento de espécies benéficas, normalmente resistentes à TC. Não foram observadas mudanças significativas na percentagem de microrganismos tetraciclina-resistentes no biofilme subgengival do grupo tratado apenas com RAR. Em geral, *Streptococcus spp.*, *Veillonella parvula*,

*Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Gemella morbillorum* e *Aa* foram as espécies resistentes mais predominantes, antes e após o tratamento. *Aa* é uma bactéria que tem um elevado MIC (32 µg/mL) à TC e possui a capacidade de penetrar o tecido adjacente à bolsa periodontal (MUNDARGI *et al.*, 2007).

Os níveis mais baixos do fármaco em outros habitats dentro da cavidade bucal, como língua, bochecha, amígdalas, placa supragengival, bem como saliva (Sakellari *et al.*, 2000), após administração sistêmica de TC, pôde ter selecionado os microrganismos mais resistentes nesses sítios, favorecendo a recolonização por estas espécies (Sbordone *et al.*, 1990). Como sugerido por Feres *et al.* (1999b), o aumento da proporção de organismos resistentes nos tecidos moles e saliva pode resultar em maior proporção de *Streptococcus spp.*, *Veillonella spp.* e *Actinomyces spp.*, espécies intrinsecamente resistentes à TC. Esta pode ser uma das razões das TCs tenham um efeito benéfico no tratamento da periodontite favorecendo a colonização do sítio subgengival com uma microbiota associada à saúde periodontal. Diferenças geográficas também influenciam nos perfis de resistência aos antibióticos. A TC local foi mais eficaz em reduzir a proporção de espécies resistentes provavelmente devido à concentração extremamente alta do antibiótico no local. Mudanças na prevalência das espécies resistentes podem ter sido resultado de mudanças ecológicas do biofilme subgengival necessárias para a colonização e estabelecimento desses microrganismos. No entanto, isto não exclui o fato de algumas espécies de microrganismos não resistentes à TC ainda estarem presentes na microbiota subgengival (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Rodrigues *et al.* (2004) concluíram que a terapia de TC local e sistêmica combinada com RAR resulta em um aumento inicial transitório na % de microrganismos resistentes, provavelmente devido a uma seleção de espécies orais intrinsecamente resistentes. A alta prevalência de agentes periodontopatógenos resistentes antes do tratamento local sugere que este deve ser considerado com cuidado e restrito a pacientes que não respondem à terapia mecânica não cirúrgica ou com a doença mais agressiva. As terapias resultaram em uma diminuição da prevalência de periodontopatógenos resistentes ao longo do tempo. A prevalência da espécie resistente *Aa*, foi significativamente reduzida no grupo tratado com TC local comparado ao de TC sistêmica.

Pode ocorrer repovoamento de anaeróbios no local tratado, de 1 a 3 meses. No entanto, a microbiota anaeróbica é fisicamente reduzida de 3 a 9 meses após tratamento com DOX, seguido por um declínio lento. Isto pode ocorrer devido: à reinfecção de outros sítios infectados e não tratados; à reinfecção de pequenas áreas dentro da bolsa periodontal; devido à falta da penetração do antibiótico nessas áreas e à reinfecção por bactérias nos túbulos dentinários ou no tecido adjacente. Entretanto, bactérias já foram observadas após RAR sozinha, sem qualquer uso posterior de antibiótico. A maioria dos tratamentos com antibióticos subgingivais reduzem a motilidade das Gram-negativas e o componente espiroqueta da microbiota, permitindo que bactérias cocos Gram-positivas, principalmente os estreptococos, repovoassem o ecossistema da bolsa periodontal. Um resultado consistente com as observações clínicas de redução do sangramento e da profundidade bolsa e do aumento do nível de inserção. Portanto, se o repovoamento de estreptococos é compatível com a saúde periodontal, afigura-se que a resistência a antibióticos pode aumentar simplesmente devido à resistência adquirida de muitos estreptococos e de outras espécies Gram-positivas (MUNDARGI *et al.*, 2007).

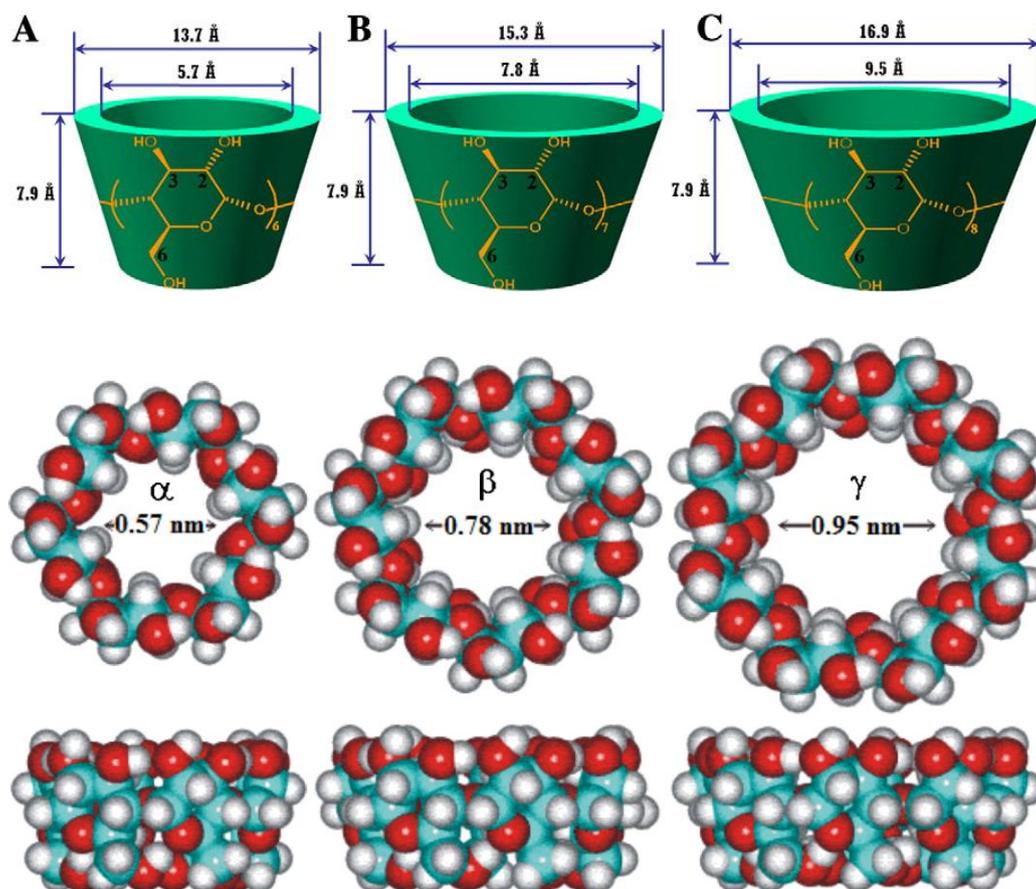
Através da saliva de outros sítios bucais, estreptococos e outras bactérias mais resistentes aos antibióticos recolonizam seletivamente os sítios periodontais tratados com sistemas de liberação sustentada. Se antibiótico residual estiver presente nos locais tratados, a microbiota resistente seria mais favorecida nestes locais em comparação aos anaeróbios Gram-negativos. Estas espécies bacterianas, frequentemente, são resistentes a outros antibióticos. Assim, os números totais de bactérias resistentes podem aumentar depois do tratamento subgingival devido ao repovoamento por espécies Gram-positivas que podem adquirir resistência aos antibióticos. Qualquer tratamento, que aumente as proporções de estreptococos e de outras bactérias Gram-positivas, pode aumentar a resistência aos antibióticos. É importante ressaltar que um tratamento periodontal não deve induzir a resistência aos antibióticos em patógenos periodontais. O sistema de administração deve manter a concentração do antibiótico por tempo suficiente para reduzir a população anaeróbia no ecossistema subgingival. A redução de periodontopatógenos, tais como Pg, Pi, *F. nucleatum*, *C. reto*, *B. forsythus* e Aa, deve ser observada imediatamente após cada tempo do tratamento. A redução destas populações anaeróbias gram-negativas é freqüentemente acompanhada por um aumento de

espécies aeróbias ou microaerófilas, como estreptococos e espécies Actinomyces. Estas espécies estão associadas à saúde periodontal, mas podem ter adquirido resistência aos antibióticos (MUNDARGI *et al.*, 2007).

#### **1.4. Sistemas de encapsulamento de fármacos e Ciclodextrinas.**

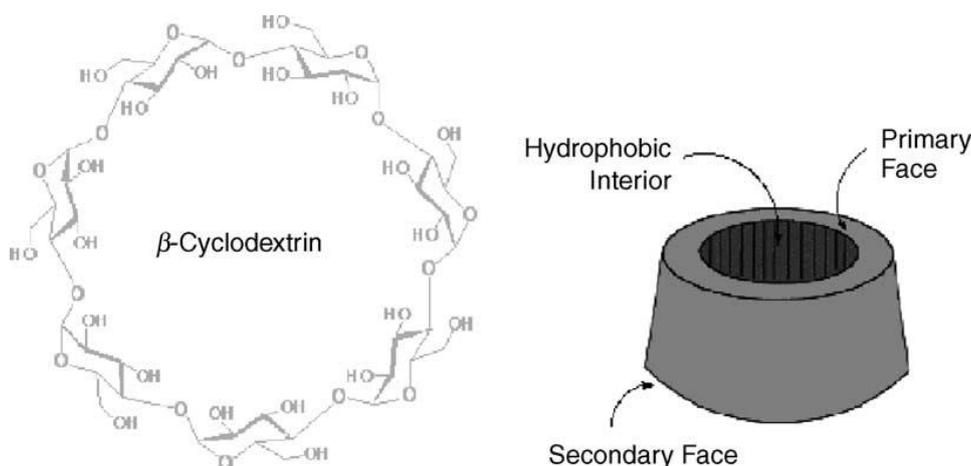
A inclusão molecular é um método farmacocinético que preserva a integridade e a estrutura do medicamento e otimiza as propriedades de um medicamento já existente, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica. Entre as estratégias encontradas na literatura estão os compostos de inclusão com ciclodextrinas (CDs). Estas foram descobertas por Villiers em 1891. São oligossacarídeos cíclicos não-tóxicos compostos de unidades de dextroses (glicoses), também referidas como cicloamiloses, ciclomaltoses ou Dextrinas Schardinger. São Macrocielos altamente biocompatíveis apresentam formato de cone truncado, uma superfície exterior hidrofílica e um interior oco hidrofóbico capaz de encapsular agentes hidrofóbicos e lipofílicos na sua cavidade não polar, sem alterar a sua capacidade intrínseca de permear membranas lipofílicas (SZENTE AND SZEJTLI, 2004, GOMES *et al.*, 2014).

As ciclodextrinas (CD's) Representam um dos sistemas de encapsulamento mais simples. Durante a sua complexação reversível abrigam os fármacos em suas cavidades, mas não são formadas nem quebradas ligações químicas covalentes, não têm propriedades redutoras e não alteram a sua estrutura. Tal interação é física e pode ser considerada como encapsulamento de substâncias na escala amolecular (MARQUES *et al.*, 2010, ZAFAR *et al.*, 2014). A Figura 3 mostra a representação das CD's naturais tipo:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .



**Figura 3.** Estrutura molecular e tridimensional das Ciclodextrinas (CDs) naturais: A,  $\alpha$ -CD; B,  $\beta$ -CD; e C,  $\gamma$ -CD. Fonte: ZHANG *et al.*, 2013 e THAMBUSAMY *et al.*, 2014.

Elas estão sendo estudadas pela sua capacidade de formar compostos de inclusão com uma variedade notável de espécies iônicas e moleculares, dentre as quais importantes princípios ativos na área farmacêutica. Destas moléculas hospedeiras, destaca-se a beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD). Os principais derivados da CD são os obtidos com a  $\beta$ -ciclodextrina. É amplamente utilizada, apresenta preço mais baixo e maior taxa de produção. É o agente preferido para o encapsulamento na indústria farmacêutica (LI *et al.*, 2005, SERAFINI *et al.*, 2012, CHEKIROU *et al.*, 2012) (Figura 4).

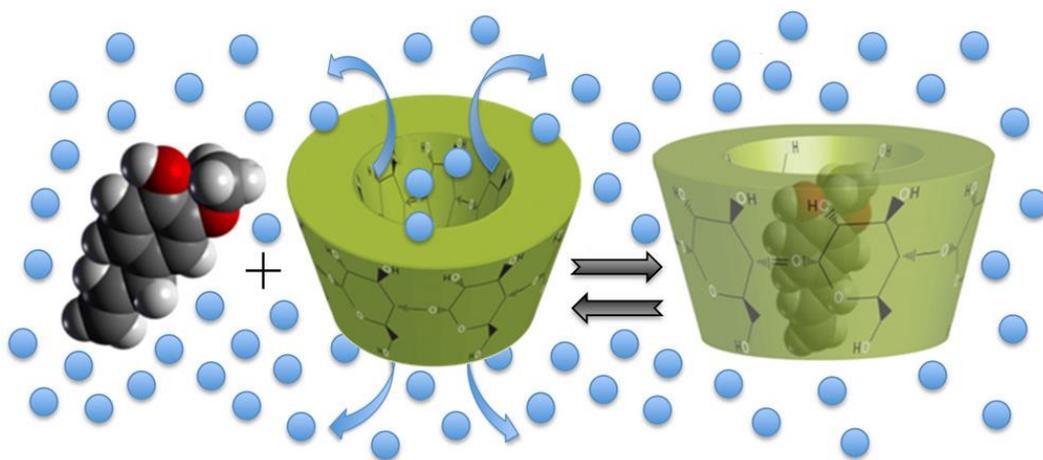


**Figura 4.** Estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina. Fonte: DEL VALLE, 2004.

As principais vantagens do uso das CD's são: estrutura química bem definida, com locais de conjugação química; diferentes tamanhos ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ); são inócuas, possuem baixa toxicidade, atividade farmacológica e solubilidade. Por possuírem uma estrutura cristalina, podem formar complexos mais estáveis com a molécula hóspede, prevenindo a degradação biológica e natural dos princípios ativos, a degradação por hidrólise e a decomposição físico-química por luz (fotodecomposição), calor e liberação de oxigênio (CORTÉS *et al.*, 2002, FONTANAY *et al.*, 2012, LIU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013, QIU *et al.*, 2014, YANG *et al.*, 2014).

A complexação de inclusão do fármaco com CDs geralmente resulta em mudanças favoráveis, intensificando e/ou aperfeiçoando os seus efeitos e propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Assim como, melhoram a interação fármaco/membrana (bioadesividade) e facilitam a adsorção do fármaco; aumentam a absorção e a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, aumentam a biodisponibilidade e estabilidade aquosa de fármacos lipofílicos como a DOX; controla o perfil de liberação de fármacos hidrossolúveis como a DOX; correção do odor e sabor desagradáveis e manchamento das TCs; redução da ação irritante do fármaco sobre as mucosas, de efeitos adversos locais e sistêmicos e de interações medicamentosas devido à diminuição da dose terapêutica, da concentração do fármaco livre abaixo da concentração tóxica e do número de

aplicações e, dessa forma, obter maior adesão do indivíduo ao tratamento. Além disso, apresentam capacidade de formar compostos de inclusão em SLFs, sem modificar a sua estrutura. Como resultado destas associações, prolongam a duração dos fármacos, tornando-os mais adequados para a liberação. (RICCI E MARCHETTI, 2006, KEMELBEKOV *et al.*, 2010, FRANCO DE LIMA *et al.*, 2012) (Figura 5).



**Figura 5.** Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina. Fonte: MURA, 2014.

## 1.6. Reparo Ósseo

O osso desempenha um papel fundamental na estrutura e no movimento do corpo, bem como a proteção dos órgãos vitais. Em mamíferos adultos, o osso é também o principal local para a hematopoiese onde as células-tronco hematopoiéticas (CTH), onde são desenvolvidas em células hematopoiéticas mielóide e linfóide, e liberadas na circulação (GOMES *et al.*, 2008).

O osso é composto principalmente de fibra proteica de colágeno (tipo I). O colágeno é um dos principais componentes da matriz extracelular (MEC) em muitos tecidos, fornecendo o principal suporte mecânico e considerado um dos biomateriais mais utilizados. Os OBs são um componente celular importante da medula óssea

para o desenvolvimento e homeostase óssea e hematopoiética, controlam a formação de osso e a hematopoiese. Os OBs participam da regulação das CTHs, linfócitos B e dos eritrócitos. Eles regulam indiretamente as CTHs, modulando as células vasculares (GOMES *et al.*, 2008).

Os OBs são uma fonte celular de eritropoietina (EPO). A principal função atribuída a EPO é na regulação da eritropoiese. A EPO osteoblástica tem capacidade de estimular diretamente a eritropoiese no microambiente da medula óssea. A EPO também participa na regulação da formação, da remodelação, da cicatrização e da reparação óssea. Além disso, aumenta o volume ósseo e a melhora das propriedades biomecânicas (GOMES *et al.*, 2008).

A perda óssea está associada ao processo fisiológico do envelhecimento. Todos os anos, quase dois milhões de indivíduos em todo o mundo submetem-se à cirurgia de enxerto ósseo, a fim de reparar lesões esqueléticas decorrentes de traumas, fraturas, da ressecção de tumores ou de doenças metabólicas e degenerativas. Embora o tecido ósseo tenha uma considerável capacidade de regeneração e a maior parte das lesões teciduais repara-se adequadamente pelo emprego de terapias e técnicas cirúrgicas usuais, o que possibilita a restauração da arquitetura e função original, ainda existem muitas situações em que este processo está dificultado, constituindo um problema em cirurgia óssea reconstrutiva. Os defeitos ósseos em humanos ganham impacto crescente e se tornaram um desafio da medicina atual (GOMES *et al.*, 2008).

A reparação tecidual óssea é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas, a integralidade funcional e mecânica, necessários para a reabilitação oral do indivíduo. Estudos têm avaliado diversos tratamentos em tecidos ósseos, com o objetivo de acelerar o processo de reparo. Estes tratamentos podem se concentrar em uma ou mais das seguintes fases do processo de reparo: inflamação pós-operatória, proliferação e migração de células mesenquimais com produção de matriz óssea e remodelação óssea (LIU *et al.*, 2007, KWAK *et al.*, 2013). Frequentemente, essa reparação é mais lenta em relação aos tecidos moles, devido à diferente morfologia e composição. Na etapa final do reparo ósseo, existe um equilíbrio dinâmico osteoclástico-osteoblástico e esse tecido ósseo se encontra em condições de suportar novos estímulos. No entanto, caso não haja um bom

suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica ou caso ocorra alta proliferação de outros tecidos locais e infecções, essa capacidade de regeneração e a completa reparação podem não ocorrer (PINHEIRO *et al.*, 2003, PEREIRA *et al.*, 2005).

Casos específicos, requerem procedimentos de enxertia (auto-enxertos ou aloenxertos) e substituição óssea. Estes processos podem resultar em infecções, reações inflamatórias, de imunogenicidade e rejeição (DRAENERT *et al.*, 2013). A fim de reparar o osso danificado ou doente e evitar complicações imunológicas, atualmente são desenvolvidos materiais de enxerto sintético com propriedade de osteocondução, osteoindução e biocompatíveis e técnicas farmacológicas inovadoras. O uso clínico de biomateriais osteocompatíveis e bioativos tem importantes aplicações na reparação e reconstrução óssea. O sucesso da utilização de um biomaterial pode ser comprometido por vários fatores locais que dependem das características do material, da manipulação durante o processo cirúrgico e da resposta do hospedeiro. O aparecimento de um processo infeccioso local é um fenômeno relativamente frequente que pode comprometer a regeneração tecidual e a osteointegração do implante ou do material implantado. O contato direto da superfície do material com sangue e / ou tecidos promove a formação de um filme de proteína adsorvida. Vários das proteínas adsorvidas (fibronectina, vitronectina e fibrinogénio) fornecem locais de ancoragem para as bactérias através da expressão de moléculas de adesão. Quando o processo de adesão é estabelecido, a bactéria prolifera e cria um processo infeccioso em estreita associação com o material implantado. Além disso, as características específicas do paciente (controle de placa, hábitos tabágicos, potencial de cura), fatores relacionados à morfologia do defeito, particularmente a morfologia do restante da parede do defeito, podem desempenhar papéis importantes no resultado reparador (PARK *et al.*, 2014).

A perda de osso alveolar é característica da periodontite. Neste sentido, estudos da bioengenharia de tecido ósseo objetivam a reparação ou regeneração do osso, doente ou fraturado, que não podem ser substituídos naturalmente. Geralmente envolve métodos que combinam engenharia de materiais e ciências da vida. A abordagem é desenvolver materiais, aumentar a atividade biológica dos fármacos que estimulam o reparo ósseo, direcionar o recrescimento ósseo *in vivo* e

a osteomodelação. É desafiador e necessário desenvolver materiais que favoreçam o reparo de defeitos ósseos (WAHL *et al.*, 2007, KWAK, *et al.*, 2014).

Deste modo, a seleção da abordagem terapêutica mais eficaz, com base em vários parâmetros que incluem a especificidade e sensibilidade dos agentes patogênicos, a farmacocinética do fármaco, dos mecanismos locais de abastecimento, a presença ou ausência de um biomaterial e fatores individuais, é essencial a fim de minimizar a perda da função do tecido, bem como reduzir o desconforto e necessidade de nova intervenção médica / cirúrgica (GOMES *et al.*, 2008).

Quanto às estratégias de regeneração óssea e a fim de controlar a colonização da ferida cirúrgica na fase de cicatrização precoce, associado à redução da infecção, foram propostos vários métodos e medidas locais e sistêmicas. A associação de um biomaterial e um agente terapêutico que pode induzir a formação de osso, enquanto previne a infecção bacteriana, com uma modulação positiva da resposta do hospedeiro contribui para uma maior previsibilidade de resultado clínico mais rápido em terapias de reparação óssea (GOMES *et al.*, 2008).

Assim, muitas vezes é necessária a utilização sistêmica de antibióticos para combater a infecção local. Nos últimos anos, dos vários antibióticos que são utilizados clinicamente, várias observações têm testemunhado a eficácia terapêutica da TC (bem como seus derivados semissintéticos como a DOX e a minociclina) na modulação do desequilíbrio imuno-inflamatório verificado em vários animais e doenças ósseas humanas. Elas têm sido muito utilizadas no campo da medicina devido as suas propriedades antimicrobianas bem caracterizadas, apresentam um espectro antimicrobiano apropriado para o tratamento de infecções ósseas e articulações e eficácia clínica comprovada. Além do efeito anti-infeccioso, estes fármacos exercem efeitos diretos no microambiente ósseo, sobre a formação e o metabolismo ósseo, que se traduzem em efeito positivo nos processos de regeneração tecidual. A TC é utilizada durante os procedimentos de enxerto ósseo, devido também à sua atividade anticolagenase, efeito antibacteriano e da propriedade estimuladora de fibroblastos (PARK *et al.*, 2014).

O tratamento local oferece muitas vantagens sobre a quimioterapia antibiótica sistêmica. TC, minociclina e DOX foram incorporadas em géis, chips, fibras poliméricas, e microcápsulas para manter um nível sustentado de antibiótico no local de infecções tais como periimplantite. Há vários relatos sobre procedimentos de enxerto ósseo combinado a aplicação TC na periimplantite. No entanto, elevados níveis de concentração antibacteriana podem ter um efeito direto e indireto sobre a viabilidade das células, especialmente OBs.<sup>7</sup> Poucos estudos foram realizados sobre estes efeitos, especialmente em relação à proteína de expressão relacionada à formação óssea e sobre a dose eficaz para as células do osso e do mecanismo subjacente. Mecanismos diferentes, distintos da ação antimicrobiana, têm sido propostos para justificar a atividade anabolizante destes agentes farmacológicos sobre o metabolismo ósseo. Estes incluem melhorar a formação óssea, diminuindo a ruptura do tecido conjuntivo e diminuindo a reabsorção óssea. A aplicação clínica desses agentes no osso promove a quelação de cátions e conseqüente avidéz do tecido mineralizado (GOMES *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2014).

Os mecanismos subjacentes aos efeitos de TCs sobre células osteoblásticas permanecem obscuros. Entretanto, mudanças são esperadas na MEC colagenosa a partir do bem estabelecido efeito inibidor das TCs nas MMPs. As TCs podem inibir a colagenase e / ou a degradação do colágeno sob uma variedade de condições. Além disso, efeitos adicionais no metabolismo do colágeno, podem ocorrer, particularmente, o aumento da síntese de colágeno, após administração de TC. A progressiva consolidação do tecido conjuntivo colagenoso é relatada na porção apical das bolsas periodontais em pacientes que recebem DSD. Estes eventos podem resultar em melhor comportamento osteoblástico, uma vez que uma matriz de colágeno estável desempenha um papel significativo na sequência de proliferação / diferenciação osteoblástica (GOMES *et al.*, 2008).

A indução de diferenciação precoce e a melhora da proliferação celular foram observadas em células osteoblástica MG63 cultivadas em dentina pré-revestida de TC. A atividade da fosfatase alcalina (FA) está associada com a disponibilidade de níveis elevados de íons fosfato, essenciais para o início do processo de mineralização, sendo posteriormente regulada para baixo. Os eventos de liberação / deposição de espécies iônicas Ca e P levam à rápida formação de uma camada de

apatita. A Taxa de deposição mineral avaliada pelo padrão de perda de Ca do meio de cultura foi ligeiramente superior nas culturas tratadas com TC, o que provavelmente está relacionado com a presença do aumento do número de células funcionalmente ativas nestas condições experimentais. Um estudo avaliou o efeito de uma variedade de antibióticos sobre células do osso trabecular humano e células MG63 e encontrou uma  $IC_{20}$  média de 60  $\mu\text{g/mL}$  para a TC. Como previamente relatado, a exposição em longo prazo, de células da medula óssea humana a 1  $\mu\text{g/mL}$  de DOX resultou num aumento do crescimento celular, enquanto níveis mais elevados causaram efeitos deletérios dependentes da dose. Efeitos positivos da TC sobre OBs também foram relatados em um modelo in vivo com metabolismo normal do osso. TC administrada durante 17 dias aumentou a atividade osteoblástica e a formação de osteóide no osso alveolar, resultado semelhante foi observado em modelos animais com doenças ósseas (GOMES *et al.*, 2008).

Gomes *et al.* (2008), avaliaram a proliferação e a função de células osteoblásticas com o tratamento de 1 $\mu\text{g/mL}$  de nível plasmático de DOX. As concentrações plasmáticas de DOX, que se obtêm com os esquemas terapêuticos anti-infecciosos normalmente utilizados, situam-se na gama dos 2 a 6  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (MARTINDALE, 1999). Gomes *et al.* (2008) observaram que os níveis terapêuticos de DOX foram capazes de induzir a proliferação de pré-osteoblastos da medula óssea humana, mantendo o seu fenótipo específico e aumentou o grau de mineralização da matriz. Houve aumento na atividade da FA e resultou em maiores depósitos de cálcio e minerais. A DOX afetou a proliferação celular de uma forma dependente do tempo. Além disso, a DOX não causou qualquer efeito anabólico nos OBs. Os resultados sugeriram que a liberação local de TCs pode associar a atividade antimicrobiana na infecção óssea relacionada a um implante, por exemplo, com uma indução da proliferação de células osteoblásticas e a manutenção da atividade biológica característica destas células. Desta forma, as TCs podem ser candidatas apropriadas para os dispositivos de liberação para a regeneração de tecido ósseo.

A DOX apresenta um espectro antimicrobiano apropriado para o tratamento de infecções ósseas. Além do efeito anti-infeccioso, este fármaco tem sido usado em Dose Subterapêutica ou Subantimicrobial de DOX (DSD) ou Baixa Dose de DOX

(BDD), às quais não apresentam atividades antimicrobianas, mas exercem efeitos benéficos nos processos de reparação tecidual e no microambiente ósseo. A caracterização destes efeitos a nível celular reveste-se de particular interesse, pois que algumas das ações farmacológicas resultantes podem modular favoravelmente a resposta do hospedeiro contribuindo para o sucesso do processo de reparação óssea (PARK, 2011, KHANDAN *et al.*, 2015; SEYMOUR E HEASMAN, 1992).

A DOX facilita a terapia reparadora, iniciando a desmineralização da camada superficial do osso. Esta desmineralização resulta na liberação de fatores osteogênicos, como fator de crescimento (TGF), fator de crescimento semelhante à insulina, e BMPs que desencadeiam a indução óssea (KAUR e SIKRI, 2013). Ela tem propriedades anticolagenolíticas e antiproteolíticas que aumentam a capacidade formadora de osso pelo OB, da quimiotaxia e da diminuição da reabsorção óssea. Ela é lipossolúvel e atinge os vários órgãos e fluídos do organismo, incluindo o microambiente ósseo. É frequentemente utilizada em preparações de liberação prolongada, situação em que as concentrações do fármaco que se obtém nas bolsas periodontais são bem mais elevadas que as observadas com a utilização sistêmica (CHAU *et al.*, 2008).

Foi previamente mostrado que DSD reduz a perda óssea alveolar em indivíduos com PC, por inibição da atividade da colagenase no FCG. Estudos também comprovaram que o uso terapêutico desta TC, em baixas doses, atua como promotor da proliferação de OBs. GOREN *et al.* (2008) avaliaram 11 pacientes pela análise de subtração digital e concluíram que não foram encontradas mudanças na altura do osso alveolar entre os 2 grupos (teste e controle), aos 3 meses. Entretanto, aos 6 meses de tratamento com DSD, a maioria dos pacientes tratados mostrou ganho na altura do osso alveolar, enquanto que a maioria dos pacientes-controle mostraram perda da massa óssea.

Em um estudo, Golub *et al.* (1997) monitoraram biomarcadores de destruição de colágeno e do osso, bem como da formação de osso e o “turnover” no FCG de indivíduos com PC e que não foram diagnosticados com osteopenia ou osteoporose em um regime de 2 meses de DSD adjuvante a RAR reduziram significativamente a atividade da colagenase e ICTP, com nenhuma mudança na osteocalcina. Inicialmente a Osteocalcina foi considerada como um biomarcador da formação

óssea por causa da proteína Gla (rica em ácido gama-carboxi glutâmico), secretada apenas pelos OBs em pequenas quantidades liberadas na corrente sanguínea. No entanto, mais recentemente, a osteocalcina tem sido considerada um biomarcador de *remodelação* ou de renovação óssea também, porque após secreção pelos OBs, esta proteína de matriz altamente aniônica liga-se ao  $\text{Ca}^{++}$  no osso mineralizado. Durante a reabsorção óssea, a osteocalcina ligada ao cálcio é liberada na circulação. Estudo sobre PC descobriram que DSD diminui o biomarcador de reabsorção óssea (ICTP), mas não afeta os níveis do biomarcador de *renovação* óssea (osteocalcina), e a taxa de remodelação óssea reflete uma combinação de formação de osso mais a de reabsorção óssea, estes achados sugerem que o tratamento com TC suprimiu a reabsorção óssea e pode ter aumentado a formação de osso, sem alterar o biomarcador ósseo osteocalcina (GOLUB *et al.*, 2008)

Payne *et al.* (2001) descobriram que mulheres pós-menopausa diagnosticadas com periodontite e perda óssea sistêmica (osteopenia ou osteoporose) e tratadas durante 1 ano com DSD mostraram menor perda de altura e de densidade do osso alveolar.

Golub *et al.* (2008) confirmaram nas amostras de FCG uma relação linear estatisticamente significativa entre o nível de atividade da colagenase e os produtos de degradação ICTP do colágeno tipo I liberados durante a reabsorção do osso alveolar (baseado no teor de piridinolina osso-específica dos fragmentos de colágeno) nas mulheres que exibem perda óssea local e sistêmica pós-menopausa. Esta correlação positiva foi mantida em indivíduos tratados com placebo e com DSD durante o ensaio clínico de longo prazo de 2 anos. Níveis anormalmente elevados desses biomarcadores no FCG podem sinalizar uma maior suscetibilidade desses indivíduos a um maior comprometimento periodontal (incluindo osso alveolar). Os efeitos benéficos da DSD nestes biomarcadores de tecido conjuntivo e de destruição óssea contribuíram para a melhoria das medidas clínicas e radiológicas da periodontite. A amplitude e a duração (2 anos) desses efeitos da terapia DSD na ausência de eventos adversos significativos (como transtorno gastrointestinal, infecção e dor) forneceram evidências do potencial terapêutico da DSD em indivíduos com periodontite caracterizada por perda óssea alveolar e em indivíduos com perda óssea sistêmica.

Bashutski *et al.* (2010) avaliaram defeitos ósseos alveolares aos 6 meses e 1 ano com administração de DSD e houve aumento estatisticamente significativo nos níveis de FA (biomarcador de formação óssea e marcador precoce da atividade de diferenciação osteoblástica).

Payne *et al.* (2011) em um ensaio clínico randomizado duplo-cego, relataram que BDD reduziu significativamente biomarcadores de reabsorção óssea, (deoxipiridinolina crosslink-fragmento do colágeno tipo I (CTX) e piridinolina crosslink-fragmento de colágeno tipo I (ICTP) e estimulou biomarcadores de formação óssea (FA específica do osso) e de remodelação óssea (osteocalcina) em mulheres pós-menopáusicas com periodontite e osteopenia (GOLUB *et al.*, 2010).

Payne *et al.* (2013) mostraram, em outro ensaio clínico com BDD com dois anos de acompanhamento, que DSD inibiu OCs e reduziu significativamente os biomarcadores de reabsorção óssea (ICTP e osteocalcina) no soro e no FCG, bem como a perda da densidade, da altura óssea alveolar, da perda de inserção e da PS. Estes autores concluíram que DSD torna o alvéolo menos suscetível à perda óssea na presença da resposta inflamatória crônica.

As expressões das proteínas relacionadas à formação óssea, como a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), o receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) e o receptor de estrogênio  $\beta$  (ER- $\beta$ ), foram avaliadas nas células osteoprecursoras por Park (2011) usando a análise de Western blot. Os resultados mostraram que a reduziram a expressão da BMP-2 e ER- $\beta$ , Níveis mais elevados de 10  $\mu$ M de DOX, TC e MINO levaram a uma diminuição da diferenciação celular e da expressão da proteína da BMP-2 e ER- $\beta$ , dependente da dose. Entretanto, Park *et al.* (2012) concluíram que uma baixa dose de DOX produziu efeitos positivos na diferenciação de células osteoprecursoras em um estágio inicial e que a DOX tem efeito osteoindutor significativo que foi alcançado principalmente através do aumento da expressão de principalmente, por aumentar a expressão do ER- $\alpha$  e do ER- $\beta$ , um dos principais receptores de estrógeno que modifica a secreção da matriz.

Os resultados de Park *et al.* (2012) mostraram que mais formação de osso novo é alcançado quando TCs foram aplicadas em combinação com material de enxerto ósseo, em defeitos criados cirurgicamente. Cerca de 5 vezes mais formação

óssea nova era alcançada quando as partículas de enxerto foram re-hidratadas com 10 µg / mL de TC. Outro estudo mostrou também que maior preenchimento ósseo foi alcançado em defeitos quando foi aplicada uma combinação de DOX e fosfato tricálcico. Estes efeitos positivos também foram relatados em humanos quando uma combinação de TC local e osso foi usado clinicamente em pacientes com periodontite. A atividade da FA aumentou significativamente em culturas crescidas na presença de 0,1 e 1,0 µM de DOX. A análise de Western blot revelou que a adição de DOX aumentou significativamente a expressão das proteínas relacionadas à formação óssea como o receptor de estrogênio ER-α, a expressão da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), da fosfo-Smad 1 / 5 e da proteína morfogenética óssea do receptor-IA.

Agarwal e Gupta (2015) não encontraram diferença significativa no reparo periodontal dos defeitos infra-ósseos entre os grupos tratados com ou sem DOX livre, ambos os grupos mostraram melhorias significativas nos parâmetros, após 6 meses. No entanto, obtiveram melhores resultados no grupo tratado com DOX, houve maior enchimento ósseo e menor reabsorção da crista.

Tetraciclinas quimicamente modificadas (TQMs) são não-antibióticos derivados de tetraciclinas antibióticas que possuem efeitos significativos sobre as células ósseas e na inibição da reabsorção óssea *in vitro* e *in vivo*. Estudos das ações em OCs de antibióticos e não-antibióticos de TC as fizeram conhecidas por inibir a reabsorção óssea através principalmente da capacidade de inibir as MMPs, que estão envolvidas na preparação das superfícies ósseas mineralizadas antes da reabsorção osteoclástica (HOLMES *et al.*, 2004).

Bettany *et al.* (2000) demonstraram que alguns compostos de TC, DOX e TQM-3 (6-desmetil, 6-desoxi, 4-dedimetilamino-tetraciclina), composto quimicamente modificado de TC análogo de doxiciclina, induzem a apoptose em OCs e inibem a reabsorção osteoclástica em co-culturas de OBs com células mononucleares da medula óssea *in vitro*. Holmes *et al.* (2004) também quiseram esclarecer se os OBs participavam na mediação da ação das TCs nos OCs e se havia relação da inibição da MMP com indução de apoptose em OCs. Eles examinaram os efeitos das TCs na formação de OCs em um sistema de cultura osteoblasto-livre e comprovaram que não-antibióticos análogos de doxiciclina (TQM-3) e minociclina (TQM-8) são potentes

inibidores da osteoclastogênese (formação de osteoclastos), elas inibem significativamente as enzimas MMPs, com  $IC_{50}$  no intervalo de 0,2-50  $\mu$ M, in vitro a partir células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) estimuladas com fator estimulador de colônias de macrófagos (MCSF) e ativador receptor de ligante NF- $\kappa$ B (RANKL), por meio de uma ação direta sobre os precursores de OCs em concentrações farmacologicamente relevantes, esta ação é independente das interações osteoblasto-osteoclasto. A MMP-13 foi escolhida no estudo de Holmes et al. (2004)<sup>61</sup> porque Greenwald et al. [19] relataram que esta MMP é a mais sensível à inibição pela TQM, e maiores concentrações de TQMs são necessárias para inibir a outros membros da família MMP (HOLMES *et al.*, 2004).

Embora seja sugerido que o TIMP-3 possa promover a apoptose através de um mecanismo independente da inibição de MMP, outras evidências indicam que TIMP-1, TIMP-2 e outros inibidores de MMP protegem contra a apoptose e promovem a proliferação em um variedade de células. Por isso, Holmes *et al.* (2004) investigaram se a inibição de MMPs com BB94 (Batimastat), um inibidor de MMP de largo espectro, pode recapitular a apoptose induzida por TQMs em OCs. A formação de OCs foi significativa e completamente abolida quando a TQM-3 ou TQM-8 foram incluídas nas culturas de PBMC a 2,5  $\mu$ g / mL. TQM-3 e TQM-8 também induziram significativamente apoptose em OCs quando foram adicionadas 5  $\mu$ g / mL à cultura. A apoptose foi evidente após 2 horas do tratamento dos OCs com TQM-3 a 20  $\mu$ g / mL e no prazo de 4 h da adição de TQM-8. O inibidor de MMP BB94 (Batimastat) não recapitulou a apoptose induzida pela TQM-3, mesmo em uma concentração onde a atividade de MMP-13 foi completamente inibida. Não houve evidência de efeito anabólico de nenhuma das TCs sobre os OBs em um ensaio de formação de colônia fibroblástica calcificante (CFU-f). Foi observada uma inibição da formação de CFU-f pela TQM-3 a 5  $\mu$ g / mL quando incluída durante a fase inicial da cultura. Os efeitos mínimos sobre CFU-f fortalecem o argumento de que TQMs não exercem uma ação anabólica através da estimulação da proliferação em precursores de OBS de camundongos não tratados. Esses dados também sugerem que os precursores dos OBs podem ser mais sensíveis aos os efeitos citotóxicos das TCs do que os OBs mais maduros. O ensaio CFU-f responde tanto para compostos anabólicos quanto para compostos inibidores e os nódulos calcificados decorrentes têm estrutura semelhante ao tecido ósseo. Este ensaio é considerado um bom modelo

da formação de osso *in vitro*. A temporização da apoptose nesta experiência sugere que a apoptose não é dependente da depleção de produtos armazenados da via biossintética do colesterol (HOLMES *et al.*, 2004).

A TQM-3 e DOX induzem apoptose em OCs, inibem a osteoclastogênese e a reabsorção osteoclástica em co-culturas de OBs e PBMC *in vitro*, mostrando que a inibição da osteoclastogênese por TCs é uma ação direta sobre precursores de OCs e não é mediada por meio de uma ação de OBs. No estudo de Bettany *et al.* (2000), não se determinou se o efeito predominante da TC sobre a formação de OCs foi mediada por uma ação direta sobre precursores de OCs ou através de alteração das interações osteoblastos- osteoclastos nas co-culturas. No estudo de Holmes *et al.* (2004), precursores de OCs foram derivados de PBMC humanas antes estimulação com MCSF e RANKL recombinante. A ausência de uma população de OBs a partir destas culturas indica que as TCs atuaram diretamente sobre precursores de OCs. A capacidade das TCs para inibir MMPs não é suficiente para induzir a apoptose de OCs. BB94 não mostrou atividade pró-apoptótica a 1  $\mu\text{M}$ , enquanto a atividade de MMP-13 foi completamente inibida. A TQM-3 induziu a apoptose a 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (25  $\mu\text{M}$ ), enquanto a inibição da atividade da MMP-13 foi incompleta. Estes dados indicam que a capacidade das TCs de induzir apoptose dos OCs não pode ser atribuída à sua atividade inibitória das MMPs sozinha. Os resultados indicaram que a inibição da formação de OCs e a indução de apoptose dos OCs são ações diretas e farmacologicamente significativas das TQMs em inibir a reabsorção óssea. O efeito pró-apoptótico é uma ação direta destes compostos sobre OCs, mas a indução da apoptose de OCs não pode ser atribuída diretamente à capacidade da TQM de inibir as MMPs (não é mediada diretamente pela inibição de MMPs) nem de ações mediadas por OBs. A apoptose induzida por TC em OCs humanos é um processo rápido e ambos os mecanismos podem contribuir para a ação anti-reabsortiva das TCs no osso (HOLMES *et al.*, 2004).

Estudos sugerem que algumas TCs podem ter um efeito anabólico no osso, que podem aumentar a formação óssea em pessoas com diabetes e em camundongos ovariectomizadas (COV) e que o efeito global provável seja devido a um aumento na formação do osso associado a uma diminuição da reabsorção óssea. Compostos com ações anabólicas significativas no osso são de grande

interesse e de ampla aplicação em doenças tais como a osteoporose. Efeitos das TCs na formação de OCs são consistentes com Aoyagi *et al.* que relataram uma redução significativa no número de OCs em COV tratados com TQM e flurbiprofeno. O mecanismo de inibição da formação de OCs não resulta da apoptose de precursores de OCs pois efeitos significativos foram observados em concentrações inferiores às necessárias para a indução de apoptose em OCs. D'Agostino *et al.* [25] indicaram que os monócitos derivados do sangue periférico humano são resistentes aos efeitos pró-apoptóticos das TCs. Se os precursores de OCs tivessem sofrido apoptose significativa nas co-culturas, a recuperação da formação de OCs teria sido mínima, já que a técnica de co-cultura não funciona de forma eficiente em baixas densidades de células mononucleares (HOLMES *et al.*, 2004)..

Estudos clínicos utilizando cultura de células e modelos animais de doença com deficiência de osso tratadas com TCs, DOX, minociclina e TCQM-1 aumentaram a formação óssea e inibiram a reabsorção óssea (GOLUB *et al.*, 2008). Camundongos diabéticos tratados com TQMs apresentaram restauração da estrutura de OBs. Além disso, os fibroblastos do ligamento periodontal dos camundongos diabéticos não tratados perderam o arranjo regular e incorporaram pouco 3H-prolina. No entanto, a administração de TC normalizou a estrutura e a incorporação de 3H-prolina pelas células do tecido conjuntivo. Estudos têm sugerido que a inibição da formação de OBs e a indução da apoptose dos OCs pode ser uma possível explicação para a inibição da reabsorção óssea. Outros estudos sugerem que a capacidade da TC de inibir a reabsorção óssea pode ser, em parte, devido à redução e inibição da atividade da colagenase (PARK *et al.*, 2012).

Terapias regenerativas para os tecidos ósseos dependem de alvos eficientes de células-tronco mesenquimais (CTMs) endógenas e transplantadas para orientar a formação óssea. A amelogenina é o componente principal da EMDOGAIN, utilizado para regenerar defeitos periodontais e apresenta propriedades de sinalização celular. A DOX aumentou a expressão do gene e da proteína Amelx. Concomitantemente, a expressão da osterix, sialoproteína óssea (BSP), osteopontina e osteocalcina, sob orientação osteogênica, foi modulada pela adição ou remoção da DOX. Durante a indução osteogênica, o sistema de regulação de TC na CTM (CTMs-TetR / Amelx) tratado com DOX mostrou aumento significativo da

expressão dos marcadores genéticos osteogênicos: osterix, do colágeno tipo I, BSP e osteocalcina, além do aumento da atividade da FA e da formação de nódulos mineralizados. A elevação da regulação dos marcadores genéticos osteogênicos resultou da expressão de Amelx exógena e não de um efeito direto da DOX. Osterix é um fator de transcrição necessário para a diferenciação dos OBs e da formação óssea. Fatores de transcrição Cbfa-1 e Osterix são essenciais mediadores de diferenciação dos OBs e a inibição completa desses genes resulta em ausência de diferenciação de OBs, contribui para deterioração da maturação dos OBs infectados e na falta da ossificação in vivo. O colágeno de tipo I é um produto primário dos OBs e a expressão aumenta nos estágios inicial e intermediário e diminui gradualmente após a formação da matriz óssea. A expressão de BSP é detectada em OBs mais diferenciados, no estágio tardio da diferenciação. BSP é uma proteína não-colagenosa de tecidos mineralizados, como o cemento e o osso, e acredita-se que seja uma molécula crítica para promover a biomineralização (WANG *et al.*, 2015).

Assim, dados os papéis dessas moléculas na osteogênese, sua regulação ascendente pela Amelx pode ter contribuído para a melhor diferenciação osteogênica da CTM. Concomitantemente, a regulação ascendente de genes osteogênicos por ativação da Amelx, a atividade da FA de CTMs-TetR / Amelx também aumentou e o tratamento com DOX aumentou a calcificação da matriz de MSCs-TetR / Amelx durante a indução osteogênica. Esses resultados forneceram evidências adicionais de que a ativação do Amelx aumenta a diferenciação osteogênica das CTMs (WANG *et al.*, 2015).

O sistema regulatório transcricional dependente de tetraciclina (Tet) é um dos sistemas de transdução mais bem estudados com eficácia estabelecida de expressão genética controlável, onde a transcrição é ativada ou desativada, reversivelmente, na presença ou ausência de um derivado Tet (DOX). O sistema regulatório Tet-dependente tem a vantagem de manter a regulação on / off pelo período de tempo desejado, sem limitação, simplesmente por adição ou remoção de DOX. Este sistema é baseado na ligação de DOX ao Tet-repressor (TetR). A expressão da Amelx no CTMs-TetR / Amelx foi aumentada ou reduzida pela adição ou remoção de DOX mesmo durante o processo de diferenciação osteogênica. O sistema Tet-dependente tem sido utilizado com sucesso para controlar a expressão

gênica em sistemas de transdução lentiviral, incluindo os aplicados às células-tronco e pode ser um poderoso método para investigar e controlar as funções de amelogenina em CTMs (WANG *et al.*, 2015).

O sistema de expressão controlável estabelecido no estudo Wang *et al.* (2015) teve a vantagem da iniciação ou da cessação controlada da expressão de amelogenina em pontos de tempo desejados, utilizado especificamente para a diferenciação osteogênica de CTMs tempo-dependente. A expressão dos genes osteogênicos: osterix, BSP, osteopontina e osteocalcina foi alterada paralelamente à expressão controlada de Amelx. Particularmente, o BSP e osteopontina foram amplamente regulados pela expressão de Amelx, o que implica que essas sialoglicoproteínas fosforiladas podem ser moléculas-alvo preferenciais para sinalização de Amelx durante a diferenciação osteogênica de CTMs.

Shimizu *et al.* demonstraram que a amelogenina estimula a expressão de BSP em OBs através da resposta do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) e do fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) promotor do gene BSP. A amelogenina promoveu a diferenciação osteogênica de CTMs através da via de sinalização Wnt / beta-catenina por regulação de Wnt10b. A via canônica Wnt /  $\beta$ -catenina é uma via de sinalização importante para a diferenciação de OBs [25].68 Olivares-Navarrete *et al.* relataram que a amelogenina e o Peptídeo de Amelogenina N-Terminal (NTAP) induziram a diferenciação osteogênica de CTMs humanas e que os efeitos da NTAP foram mediados pela ativação de PKC e ERK1 / 2 e degradação de  $\beta$ -catenina. A expressão Runx2 não foi significativamente afetada pela expressão controlada de Amelx. Embora Runx2 seja um fator transcricional crucial para a diferenciação de OBs, o osterix exerce sua função osteogênica através de mecanismos independentes de Runx2. A expressão controlada de Amelx pode, portanto, ter osterix regulada através de vias independentes de Runx2, que por sua vez promovem a expressão de outros genes osteogênicos (WANG *et al.*, 2015).

A diferenciação osteogênica de CTMs é um processo bem orquestrado que começa com a ativação de fatores de transcrição, incluindo Runx2 e osterix. No estágio final da sequência de desenvolvimento de OBs, BSP, osteopontina e osteocalcina servem como reguladores do processo de mineralização. Muitos estudos demonstraram que o Derivado da Matriz de Esmalte (DME), o componente

ativo da Emdogain que contém fatores de crescimento heterogêneos, incluindo amelogenina, estimula as células mineralizantes para aumentar a atividade da FA e a produção de osteopontina, BSP e osteocalcina (WANG *et al.*, 2015).

Matsuzawa *et al.* relataram que a amelogenina recombinante aumentou os níveis do colágeno do tipo I e da osteocalcina em OBs. Zeichner-David *et al.* relataram que a amelogenina recombinante induziu a expressão de BSP e osteocalcina, mas regulou para baixo o colágeno do tipo I em células do ligamento periodontal. Nos cementoblastos, a amelogenina recombinante e o péptido de amelogenina rica em tirosina reduziram a BSP e a osteocalcina e inibiram a formação de nódulos minerais. Portanto, os efeitos da amelogenina na diferenciação osteogênica podem depender do tipo de célula e do uso de péptidos. 78 Quanto aos efeitos da amelogenina nas CTMs, o aumento da osteogênese foi relatado após o tratamento com amelogenina recombinante ou NTAP (WANG *et al.*, 2015).

## 1.7 Propostas e hipóteses da pesquisa

No Brasil existe alta prevalência da periodontite na população adulta. Cerca de 80% apresenta algum problema periodontal (SB 2010) e grande número de indivíduos com dificuldade de controle da doença durante o tratamento não cirúrgico, considerado padrão-ouro. Devido à importância da DOX na reparação periodontal (GIANELLI et al., 2008) e apresentar efetividade na redução da periodontite em seres humanos (MOURA et al., 2015), este estudo propõe o desenvolvimento de um novo gel de liberação controlada de DOX a 10%, encapsulada em  $\beta$ -CD e avaliar comparativamente o resultado clínico-radiográfico com 10% de DOX pura em gel, como tratamentos adjuntos à RAR, na periodontite crônica.

A hipótese levantada na pesquisa é que o duplo encapsulamento da DOX, em polímero e no composto de inclusão com  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD/DOX), como um veículo de liberação indireta, possa aumentar a permanência do gel e sua mucoadesividade, contato entre o medicamento e a mucosa, melhorar a disponibilidade da DOX e prolongar a ação do princípio ativo no FCG após a sua liberação da  $\beta$ -CD, transportador direto do fármaco. O objetivo é aumentar a concentração local de DOX, por um regime de não ocupação do espaço, a fim de não interferir na adesão das células do ligamento periodontal. Fator que pode manter e melhorar significativamente a substantividade da DOX, aderência à superfície da raiz. Além disso, que a beta-ciclodextrina expondo indiretamente a DOX possa evitar manchamento da superfície radicular, diminua a hidrossolubilidade da DOX, a proteja da decomposição físico-química, prolongando os efeitos terapêuticos da DOX, anti-inflamatórios e osteogênicos, associados à redução da resposta inflamatória (JEERVOE-STORM et al., 1996, IOANNOU et al., 2010, NICKLES et al., 2016) e conseqüentemente, promova aumento da densidade óssea e a melhora dos parâmetros clínicos da CP obtidos após SRP. O gel proposto neste estudo não foi previamente relatado na literatura.

Assim, a presente pesquisa é importante, uma vez que através do conhecimento adquirido, espera-se expandir a compreensão do efeito de uma ação mais prolongada da DOX e a perda óssea periodontal e levar a novas soluções de tratamento.

## **1. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Avaliar o efeito da aplicação subgengival de um sistema de liberação controlada de 10% doxiciclina:  $\beta$ -ciclodextrina em gel, adjuvante à raspagem e alisamento radicular, nos parâmetros clínicos e nas densidades ósseas interproximais, em indivíduos com periodontite crônica.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Avaliar comparativamente o efeito dos tratamentos com géis de doxiciclina a 10%, com e sem  $\beta$ -ciclodextrina, adjuvantes à raspagem e alisamento radicular, nos parâmetros clínicos periodontais: Sangramento à Sondagem (SS); Nível de Inserção Clínica (NIC) e Profundidade de Sondagem (PS), e o Índice de Placa Visível (IPV), em indivíduos com periodontite crônica.

2.2.2. Avaliar comparativamente o efeito dos tratamentos com géis de doxiciclina a 10%, com e sem  $\beta$ -ciclodextrina, adjuvantes à raspagem e alisamento radicular, na densidade óssea interproximal, por meio da técnica de análise fractal antes e após os tratamentos.

### 3 METODOLOGIA EXPANDIDA

#### 3.1. Desenho do estudo

Este estudo clínico, randomizado e duplamente mascarado foi projetado para comparar os efeitos do gel de doxiciclina a 10% aos efeitos de um gel doxiciclina a 10% incluída em  $\beta$ -ciclodextrina, como adjuvantes à RAR (padrão ouro), no tratamento da periodontite crônica de indivíduos da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. O avaliador e os participantes não conheceram o tipo de gel aplicado.

O estudo foi conduzido, de acordo com os princípios descritos na Declaração de Helsinki para experimentos envolvendo seres humanos, de 1975, conforme revisada em 2013 e após sua aprovação no Comitê de Ética em pesquisas (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (COEP: 790.967) (Anexo1) e Plataforma Brasil (CAEE 32011214600005149). O teste está registrado no ClinicalTrials.gov, número de registro RBR-243GF6. Todos os indivíduos foram esclarecidos dos riscos e benefícios envolvendo os procedimentos e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), de acordo com a Resolução n° 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde (Anexo 2).

Para a seleção da amostra, foi realizada triagem em cerca de 170 indivíduos. Os participantes foram acompanhados até 18 meses após o tempo inicial. A elegibilidade foi determinada durante a triagem com realização de um exame clínico periodontal e o histórico médico-odontológico.

Os critérios de inclusão foram:

- 1) Indivíduos apresentando diagnóstico de periodontite crônica (AAP- 1999);
- 2) Indivíduos com quadrantes contralaterais contendo pelo menos um molar com presença de sítios com profundidade de sondagem  $\geq 5$  mm, nível de inserção clínica  $\geq 6$ mm e sangramento à sondagem;
- 3) Maiores 18 anos.

Os critérios de exclusão foram:

- 1) Presença de alterações periapicais e pulpares, de gengivite e de quadros periodontais agudos.
- 2) Presença de candidose e alterações na mucosa;
- 3) Alergia aos componentes dos géis e ao curativo periodontal;
- 4) Presença de doenças sistêmicas, imunodeficiências, transplantados e osteoporose;
- 5) Necessidade de profilaxia antibiótica antes do tratamento periodontal;
- 6) Uso de antibióticos sistêmicos, quimioterápicos de uso controlado ou contínuo e que possam interferir no processo inflamatório ou ter efeitos adversos direto no periodonto, nos últimos 6 meses;
- 7) Gravidez e usuárias de anticoncepcionais durante o estudo e nos três meses anteriores ou em lactação;
- 8) Fumantes;
- 9) Tratamento periodontal cirúrgico ou não cirúrgico nos últimos 6 meses;
- 10) Tratamento com bochecho de clorexidina 0,12% ou outro agente químico tópico nos últimos 6 meses.

Os dados foram registrados em prontuários (Anexo 3). Estes exames e as reavaliações foram realizados por um único examinador previamente treinado por um professor especialista em periodontia.

Previamente ao estudo principal foi realizado um estudo piloto para testar e avaliar a metodologia proposta para o estudo principal. O estudo piloto foi realizado na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Os indivíduos que participaram do estudo piloto não participaram do estudo principal.

O estudo piloto com 6 indivíduos foi realizado para o treinamento do pesquisador para os procedimentos relativos aos exames clínicos e tratamento periodontal. As medidas de PS obtidas durante o estudo piloto foram registradas e repetidas no período de uma semana. Posteriormente os dados de PS foram testados através do teste de Kappa (K) e os resultados demonstraram valores satisfatórios  $Kappa > 0,8$ . Para a avaliação dos

parâmetros radiográficos foi realizado o treinamento entre os dois observadores.

Após análise dos periodontogramas, foram selecionados dois molares de cada indivíduo, em quadrantes contralaterais. Não foram incluídos os terceiros molares e os elementos com furca e lesão endo-periodontica. Em cada dente, as medições foram efetuadas em 4 sítios (vestibular, lingual, mesial e distal), com PS  $\geq$  5 mm e NIC  $\geq$  6mm. Sempre eram selecionadas as bolsas de maior profundidade. Em todas as análises dos parâmetros clínicos (PS, NIC, SS e IPV) utilizou-se isolamento relativo, jatos de ar suaves e a sonda periodontal Hu-Friedy (Chicago, EUA) (Figura 5).

### **3.2. Cálculo Amostral**

O tamanho da amostra foi calculado com auxílio do programa estatístico (versão 19.0 para Windows. SPSS, IBM, Armonk, NY). A amostra foi composta por N amostral mínimo de 24 indivíduos (8 por grupo), com um nível de significância de 5%. Considerando a possibilidade de desistência, foram selecionados 12 indivíduos por grupo, totalizando 36 indivíduos na pesquisa. Três indivíduos saíram voluntariamente do estudo em T0, sendo um do GI e dois do GIII. Portanto, neste estudo participaram 33 indivíduos, sendo 9 homens (27%) e 24 (73%) mulheres. Foram avaliados 264 sítios (33 indivíduos  $\times$  2 dentes  $\times$  4 sítios (V, L, M, D): 88 do GI, 96 do GII e 80 do GIII. O parâmetro nível clínico de inserção (NIC  $\geq$  6 mm) foi selecionado como principal variável para a determinação da periodontite e também para determinar o tamanho do N da amostra (MIANI *et al.*, 2010).

### **3.3. Mascaramento e tempos da pesquisa**

O processo de randomização resultou em valores médios similares para todos os parâmetros clínicos analisados em todos os grupos no exame inicial. Os trinta e três indivíduos foram distribuídos, por meio de aleatorização simples, em três grupos independentes:

Grupo I: RAR + gel de 10% DOX

Grupo II: RAR + gel de 10% DOX incluída em ( $\beta$ -CD).

Grupo III (controle): indivíduos receberam somente RAR.

Os indivíduos foram avaliados nos três tempos da pesquisa:

T0 - início do estudo e primeira aplicação dos géis.

T1 - 30 dias após T0 e segunda aplicação dos géis.

T2 - 60 dias após T0.

T3 – 18 meses após T0.

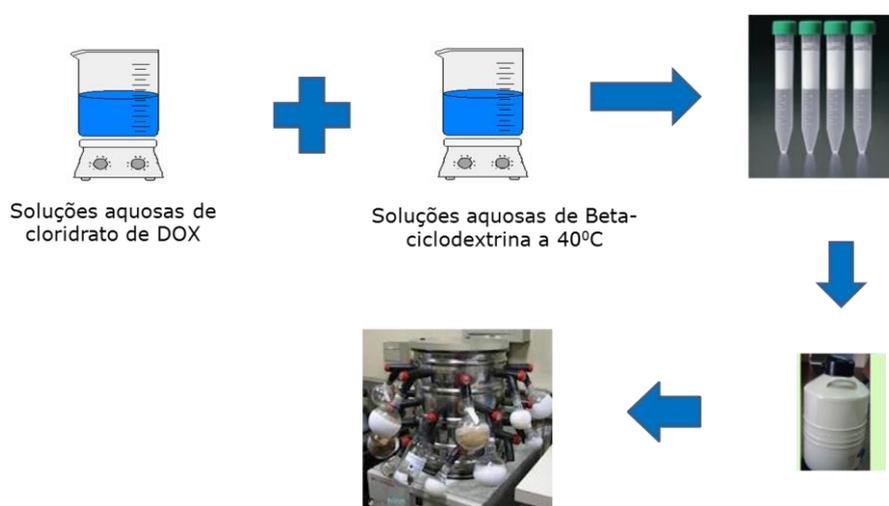
### 3.4. Preparação do composto de inclusão e dos géis

A inclusão de DOX /  $\beta$ -CD foi preparada em razão molar 1:1. A solução aquosa de DOX (PM: 480.99 g/mol) (Sigma®, St. Louis, EUA) foi preparada ficou constante durante meia hora. Em seguida, adicionou-se a solução aquosa de  $\beta$ -ciclodextrina (PM: 1135 g/mol), a 40° C (Cerestar, EUA). Após homogeneização, a solução resultante foi distribuída e congelada em nitrogênio líquido e liofilizada. No processo de liofilização da solução aquosa utilizou-se o equipamento *Savant Modulo D-Freeze Dryer* da *Thermo-Electron Corporation*® (NY, EUA) (PATARO et al., 2003) (Figura 4).

Para a confecção dos géis foram necessários os seguintes reagentes: propilenoglicol (15%); hidroxipropilmetilcelulose (3%); água destilada (q.s.p); metilparabeno (0,15%) e / ou DOX (10%) normalizada a 10% da DOX quando incluída em  $\beta$ -CD (Tabela 1). Pesou-se a quantidade exigida de cada componente de acordo com a quantidade total a ser preparada. Os conservantes, antioxidantes, metilparabeno e o composto de inclusão foram adicionados à água sob agitação mecânica. Em outro recipiente misturou-se a DOX ao propilenoglicol e adicionados à primeira solução sem o composto de inclusão. Quando se utiliza o propilenoglicol

como veículo para a DOX, esta apresenta maior penetrabilidade dentinária do que quando o veículo é a água (Patente PI0405347-8, 2004) (CORTÉS et al., 2002) (Apêndice 3). A manipulação dos géis empregados neste estudo foi realizada por um farmacêutico.

Após repouso por 24 horas para estabilização, os géis foram acondicionados em seringas de 5 mL descartáveis e de cores distintas (Figura 5).



**Figura 6.** Preparação do composto de inclusão e dos géis.

**Tabela 1.** Composição do gel de 10% Doxiciclina em  $\beta$ -CD (razão molar 1: 1).

Componentes	Concentração (%)
Doxiciclina	10%
Propilenoglicol	15%
Hidroxipropilmetilcelulose	3%
Metilparabeno	0,15%
$\beta$ -CD	Razão molar 1: 1
Água destilada qsp	100,00

### 3.5. Avaliação dos parâmetros clínicos e tratamentos periodontais.

Antes do início da pesquisa, todos os indivíduos receberam instrução de higiene oral, incluindo técnica de escovação e de limpeza interdental com uso de fio/fita e/ou escova interdental. Eles participaram de um programa de controle do biofilme, realizado por polimento coronário com pasta profilática e escova de Robinson, até alcançar IPV < 20% (índice dicotômico), considerado adequado. Os indivíduos receberam orientações verbais e escritas para não alterarem o auto-padrão de higienização oral (MENDES *et al.*, 2010).

Em cada exame periodontal, foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: profundidade de sondagem (PS - distância em milímetros entre a margem gengival livre e a porção mais apical da bolsa periodontal); Nível de Inserção Clínica (NIC - distância em milímetros entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical da bolsa periodontal); Sangramento à Sondagem (SS), presente ou ausente. O SS foi anotado 10 segundos após a sondagem (AINAMO e BAY, 1975). Índice de Placa Visível (IPV) presente ou ausente (SILNESS e LÖE, 1964). Depois de registrar os parâmetros clínicos, a RAR foi realizada usando instrumentos manuais com remoção do biofilme supra e subgengival e do cálculo. O procedimento foi realizado para obter lisura na superfície da raiz (GUPTA *et al.*, 2008).

Os tratamentos clínicos e periodontais de todos os indivíduos, nos três períodos experimentais, foram realizados pelo mesmo profissional na seguinte sequência: anotação do IPV; remoção do biofilme supragengival e avaliação dos parâmetros clínicos: PS, NIC e SS. Em T0, realizou-se a RAR e os raios X iniciais (interproximais de molar) em todos os indivíduos, antes da primeira aplicação de gel no GI (gel 10% DOX) e no GII (gel 10% DOX /  $\beta$ CD), nos dois dentes determinados por indivíduo. Nos 30 dias após a primeira aplicação (T1), foi realizada RAR em todos os indivíduos e a segunda do gel no GI e GII. Nos 60 dias (T2) após a primeira aplicação e 30 dias após a segunda aplicação foram realizados RAR e raios X (interproximais de molar) em todos os indivíduos. Após 18 meses, foram realizados somente os raios X finais.

### 3.6. Aplicação dos géis

Os tubos contendo os géis de DOX (gel de doxiciclina a 10% e gel 10% doxiciclina:  $\beta$ -ciclodextrina) foram marcados, por uma pessoa de fora da pesquisa, com fitas de cores distintas e mantidos em gelo. Ambos os géis eram de cor, cheiro e sabor semelhantes. No momento da aplicação, o gel era inserido na seringa de 5mL descartável com ponta romba (cânula de calibre 2/3) (Figura 5). Após isolamento relativo, este era aplicado lentamente até atingir a margem gengival. O excesso era removido cuidadosamente com auxílio de uma cureta e gaze estéril. Em seguida, aplicou-se uma barreira fotopolimerizada por 40 segundos (TOP DAM®) para selar o gel na bolsa. As aplicações foram realizadas nos GI e GII, nos 2 dentes determinados por indivíduo, no tempo inicial (T0), e reaplicadas após 30 dias (T1). As aplicações foram realizadas por um mesmo profissional que, assim como os indivíduos, desconheciam o tipo de gel aplicado.

Após a introdução dos géis de DOX, os indivíduos foram instruídos a evitar alimentos duros ou pegajosos, não tocar na área com língua ou dedo, manter a higiene oral e informar imediatamente, a presença de dor, inchaço e quaisquer outros problemas e efeitos adversos.



**Figura 7.** Materiais utilizados nos tratamentos, coleta das amostras e avaliação dos parâmetros clínicos.

### 3.7. Avaliação radiográfica

A Academia Americana de Periodontia apontou que indivíduos com periodontite tratada podem apresentar locais com perda progressiva de tecido. Muitos sinais e sintomas de periodontite podem ser diagnosticados clinicamente e com radiografia. Quando identificada na fase inicial, mais fácil é o processo de tratamento. O estudo do osso cortical e trabecular podem evidenciar os sinais iniciais desta patologia. Contudo, a avaliação da estabilidade ou da progressão da periodontite não é possível com qualquer método de diagnóstico comumente usado e nenhum método de diagnóstico estava atualmente disponível para demonstrar os estágios iniciais de transição à periodontite (SENER et al. 2015).

Uma avaliação sensível e precisa de alterações do osso e da crista alveolar é um pré-requisito para o diagnóstico, tratamento e prognóstico da periodontite. É de suma importância avaliar a atividade da periodontite, visto que mudanças nessa arquitetura são clinicamente indiscerníveis. Esta discriminação é essencial para a implementação de um tratamento adequado. Em indivíduos com periodontite, o objetivo da terapia é prevenir progressão da doença. Portanto, a detecção precoce da perda óssea é crucial para evitar grandes danos aos tecidos. Para identificar a perda óssea inicial em sítios aparentemente saudáveis (de uma perspectiva clínica / radiológica) são necessários o desenvolvimento de métodos específicos para o diagnóstico (SENER et al. 2015).

Embora a radiografia seja um dos mais adequados métodos para o diagnóstico periodontal, apresenta valor limitado na detecção precoce de alterações sutis do osso, porque imagens bidimensionais (convencional ou digital) têm várias desvantagens, como sobreposições, distorções e ampliação do tamanho de defeitos ósseos. Uma série de índices, qualitativos e quantitativos, baseados em radiografias e técnicas de processamento e análise de imagem foram desenvolvidos para avaliar a qualidade dos ossos, observar os sinais de reabsorção para permitir a quantificação da massa óssea, arquitetura trabecular e largura cortical, razão do grau de reabsorção da crista alveolar e dimensão fractal (DF). Em vários estudos, mostrou-se que a diminuição da Densidade Mineral Óssea (DMO) afeta a

propriedade morfométrica, densitométrica e arquitetônica do osso. Estudos anteriores relataram correlações significativas entre DMO e espessura cortical (SENER et al. 2015).

Outros métodos, como a radiografia de subtração e Análise Fractal (AF), são propostas para diagnóstico de defeitos periodontais. A radiografia de subtração foi introduzida como uma técnica que facilita a visualização qualitativa e quantitativa da densidade trabecular no osso alveolar, extraindo as estruturas inalteradas da imagem. Mostrou-se ser mais precisa para detecção precoce de mudanças do que a radiografia convencional.<sup>6</sup> No entanto, o método é extremamente sensível à técnica, com dificuldade de padronização da geometria de projeção e requer equipamentos especializados, assim não foi amplamente aceito (SENER et al. 2015).

*A AF independe da geometria de projeção e revela mudanças em cada estágio da redução óssea e pode ser usada para prevenir a progressão ou presumir o prognóstico da periodontite. O objetivo é usar esse método prospectivamente a fim de identificar indivíduos com risco relativamente maior à periodontite e oferecer um diagnóstico complementar para controlar a variação da subjetividade do observador na interpretação clínica de casos limítrofes. Está sendo aplicada em vários ramos da odontologia relacionados à avaliação óssea (ARMITAGE et al., 2003, JOLLEY et al., 2006, SINDEAUX, et al., 2014, SENNER, et al., 2015).*

Em 2013, Payne et al. mostraram que a perda da densidade óssea alveolar, é considerada como um sinal precoce da periodontite e precede a perda em altura. Sener et al. (2015), realizaram um estudo e concluíram que a AF é um método quantitativo de avaliação de imagem, representado numericamente como DF. DF em radiografias periapicais foi usado como um identificador do padrão do complexo do osso alveolar em torno da dentição. A AF pode discriminar quantitativamente mudanças no padrão, arquitetura e integridade do osso alveolar, trabecular na área interproximal, antes de ocorrer a perda óssea. Três outros estudos demonstraram a potencial aplicação da AF para avaliar as alterações de osso associadas à periodontite. Portanto, pode ser recomendada como um método objetivo para o diagnóstico, na detecção precoce de alterações ósseas associadas aos estágios iniciais da periodontite e pode ser usado para o monitoramento e descrever padrões estruturais complexos. Desta forma, o método de análise de imagem realizada no

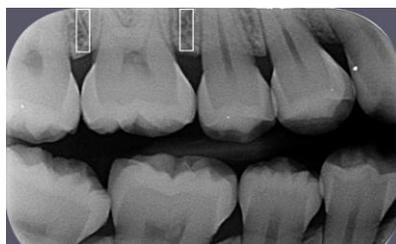
presente estudo, através da AF, pode detectar diferenças no aumento da densidade óssea entre os grupos.

As imagens digitais interproximais da região posterior da maxila e mandíbula, de 33 indivíduos foram realizadas no serviço de radiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-UFMG), durante o exame clínico. As radiografias foram realizadas pelo mesmo profissional, utilizando a técnica de paralelismo. Uma unidade de raio-x intraoral (Kodak 2100, Eastman Kodak, Rochester, NY) com filtração equivalente de alumínio de 60 kVp, 7 mA e 2,5 mm foi utilizada em uma distância foco-receptor de 40 cm e um tempo de exposição de 0,12 segundos. Nenhuma radiografia adicional foi adquirida.

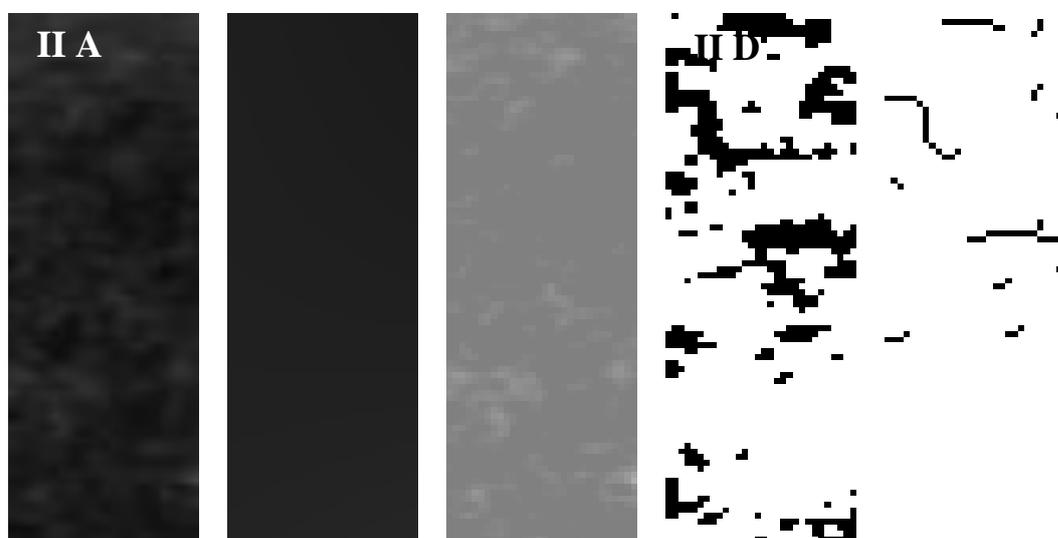
A avaliação final foi efetuada por dois especialistas, cegos para os diferentes tratamentos, que analisaram a densidade radiográfica dos defeitos ósseos pelo método da análise fractal (AF) (Figura 7). Duas regiões retangulares de interesse (*ROIs*) (90 x 30 pixels) foram selecionadas em duas áreas diferentes do osso interdental maxilar posterior, não incluindo o espaço radicular ou periodontal (Figura 7). O tamanho do ROI retangular foi selecionado de acordo com os tamanhos do osso interdental a serem analisados, como anteriormente mencionado por Sener, et al. (2015). A média dos dois *ROIs* foi usada para calcular a Dimensão Fractal (DF) para cada sujeito, pelo Método de Contagem de Caixas (*box-counting method*), descrito por White e Rudolph (1999) e Sindeaux et al. (2014).

As imagens resultantes da digitalização das placas foram processadas com o objetivo de remover variações, brilho da imagem ou presença de sobreposição parcial de tecido mole. Para este fim, 200 *ROIs* foram duplicados usando o filtro gaussiano desfocado com um diâmetro de 35 pixels. Este procedimento elimina todos os detalhes de fina e média escala, e mantém apenas as variações de grande densidade (Figuras 8A e 8B). Após a subtração da imagem desfocada da original, uma imagem com um valor cinza médio de 128 pixels foi obtida no final deste procedimento (Figura 8C). A imagem foi realizada usando a opção binária e invertida (Figura 8D). Depois de erodir e dilatar uma vez, foi congelada para revelar características que podem ser medidas (Figura 8E) (Sener, et al., 2015). Todos os processamentos e análises de imagens, assim como o cálculo da DF, foram

realizados usando um sistema de software de imagem (software ImageJ v.1.51j8, National Institutes of Health, Bethesda, MD).



**Figura 8.** Radiografia interproximal da região posterior de maxila e mandíbula. Técnica de paralelismo. Áreas das densidades ósseas avaliadas (ROIs). Fonte: Serviço de radiologia da FO-UFMG.



**Figura 9.** Processamento de ROI para cálculo do DF. A) ROI duplicado. B) ROI desfocado pelo filtro gaussiano. C) Imagem resultante depois de subtrair a imagem desfocada da original e adicionados 128 pixels. D) Binária e em seguida, a versão invertida da imagem. E) Imagem congelada.

### 3.8. Análise estatística dos dados

Todos os dados clínicos coletados foram analisados através do programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, IBM, Armonk, NY), versão 19.0 para Windows, pela consultoria Jr. de Estatística da UFMG (ICEX). A média e/ou a mediana desses dados foi calculada para cada indivíduo e para cada grupo separadamente.

A comparação dentro de cada grupo foi determinada ao longo do tempo pela técnica Análise de Variância por Blocos (ANOVA). O nível de significância utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Na comparação entre os grupos, foram realizados o Teste  $t$  e o teste não paramétrico de Friedman, dependendo da distribuição dos dados. O Teste de Mann Whitney foi utilizado para avaliar se a média ou mediana de um grupo foi igual ou inferior à outra. O nível de significância considerado foi de 3% ( $p < 0,003$ ).

Nos resultados para as variáveis não numéricas (SS e IPV) foram utilizados o Teste de *Qui Quadrado* e Análise de Correspondência. O nível de significância utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

Nas análises radiográficas, a média dos dois *ROIs* foi usada para calcular a dimensão fractal para cada participante. Os resultados foram comparados estatisticamente, pela ANOVA, ao longo do tempo e entre os grupos para avaliar a consistência dos mesmos. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Esta tese foi estruturada segundo os preceitos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Geras (FO-UFMG), dessa forma, os resultados e discussão serão apresentados na forma de artigo científico.

**ARTIGO**

Formatado segundo as normas do periódico *Journal of Dental and Oral Health*.

**DOXYCYCLINE ENCAPSULATED IN  $\beta$ -CYCLODEXTRIN ON THE PERIODONTITIS: CLINICAL TRIAL**

Vivianne Trajano<sup>1</sup>, Cláudia Brasileiro<sup>2</sup>, Jonatas Henrique<sup>2</sup>, Ruben Sinisterra<sup>3</sup>, Célia Lanza<sup>2</sup>, Luís Cota<sup>4</sup>, Maria Esperanza Cortés<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, *Universidade Federal de Minas Gerais*. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

<sup>2</sup>Department of Oral Clinical, Surgery and Pathology, Faculty of Dentistry, *Universidade Federal de Minas Gerais*. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

<sup>3</sup>Department of Chemistry, ICEX, *Universidade Federal de Minas Gerais*. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

<sup>4</sup>Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, *Universidade Federal de Minas Gerais*, Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

\* Corresponding author at: Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, *Universidade Federal de Minas Gerais*. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais. E-mail address: [mecortes@ufmg.br](mailto:mecortes@ufmg.br)

## ABSTRACT

Local release devices are investigated because the additional benefit to the Scaling and Root Planning (SRP). This study aims to compare the efficacy of doxycycline in  $\beta$ -cyclodextrin (DOX)/ $\beta$ CD) with DOX- alone in gel. Thirty-three subjects with chronic periodontitis were randomized into GI (10% DOX + SRP); GII (10% DOX /  $\beta$ -CD + SRP) that received an application of the gels at T0 and T1, and GIII SRP. The Periodontal Probing Depth (PPD), Clinical Attachment Level (CAL), Bleeding on Probing (BOP) and Visible Plaque Index (VPI) were evaluated at (T0), 30 days (T1) and 60 days (T2) of a clinical trial. The bone density was analyzed after 18 months. The GII showed the most significant reduction of PPD (2.62 mm) ( $p < 0.003$ ), and the highest gain in CAL (2.54 mm) at T2 ( $p < 0.003$ ). The BOP and VPI had a strong reduction in all groups at T2 ( $p < 0.05$ ). Both decreased  $\geq 5$  times and twice, respectively, at T1 for all groups. The bone density increased in all groups up to 60 days (T2). The DOX included in  $\beta$ -CD gel associated with SRP showed a significant improvement in periodontal clinical parameters and may be an important chemotherapeutic for chronic periodontitis.

Keywords: doxycycline,  $\beta$ -cyclodextrin, gels, chronic periodontitis, scaling

## Introduction

Antibiotics have been used in periodontal treatment in order to minimize the therapeutic failures of the mechanical debridement by scaling and root planning (SRP), which is considered the gold standard procedure [1]. The application of antimicrobial agents in slow release systems into the periodontal pockets provide a constant release of the drug, eliminating the pathogens and modulating the inflammatory response, therefore limiting tissue destruction. Studies have demonstrated the efficacy and benefits of these systems when compared to systemic ones [2,3].

Doxycycline (DOX), acts in Gram-positive and Gram-negative bacteria and on specific periodontal pathogens [4]. Its main antibiotic mechanism of action is the inhibition of protein synthesis [5]. It presents anti-inflammatory properties by directly inhibiting the activity of matrix metalloproteinases (MMPs), which participates in periodontal tissue destruction [6,7] and it is considered the most potent anti-collagenase agent [8-10]. The osteogenic effect of DOX occurs because it favors bone tissue formation by the activation of osteoblasts and by bone resorption inhibition [11]. At subtherapeutic levels, DOX has beneficial effects on bone tissue repair processes and modulation of the host response [5] Thus, the non-antimicrobial properties of DOX may contribute to its effectiveness of periodontitis [12,13].

The gel produces a contact surface between the drug and the mucosa and prolongs its effects [3,8,14]. However, in periodontitis the rate of renewal of the gingival crevicular fluid (GCF) is increased due to the exudate of the inflammation process, promoting faster diffusion of the drug from the delivery device [15]. Thus, one

important goal in the development of drug delivery systems remains in to maximize the adhesiveness [16].

The 10% DOX gel has been used in the treatment of chronic periodontitis (CP) and proved to be more effective in reducing periodontal probing depth (PPD) and improving clinical attachment level (CAL), when compared to SRP alone, improving the quality of life of individuals with periodontitis [17-19]. However, Garrett et al. [20] verified that the treatment of moderate to severe periodontitis with 10% DOX was as effective as SRP.

Thus, in order to improve efficacy and prevent drug physico-chemical and biological degradation, molecular inclusion strategies have been investigated, among them, cyclodextrins (CDs). The beta-cyclodextrin ( $\beta$ -CD) has advantages such as the capability to form drug carrier systems; increased solubility; bioavailability; aqueous stability of lipophilic drugs; controls the release profile of water-soluble drugs, such as DOX. As a result, there is an increase in therapeutic efficacy and reduction of local and systemic adverse effects [21, 22].

Therefore, the purpose of this study was to assess the clinical outcome following treatment of CP with 10% DOX encapsulated in  $\beta$ -CD gel and pure 10% DOX in the gel. The hypothesis is that the inclusion compound may increase the mucoadhesiveness of the gel and the encapsulation of DOX in  $\beta$ -CD, enhances its local effects.

## Materials and methods

### Study Design and study sample

This randomized, double-blinded, clinical trial was designed to compare the effects of 10% DOX gel to 10% DOX gel included in  $\beta$ -cyclodextrin as adjunctive topical agents the SRP for the treatment of chronic periodontitis. The evaluator and the participants didn't know the type of gel applied. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (790.967). The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

The trial is registered at ClinicalTrials.gov, number registered RBR-243GF6. Participants were selected in the Faculty of Dentistry of the Federal University of Minas Gerais and they all signed a free informed consent form. Eligibility was determined by periodontal clinical evaluation and medical history at screening visits. Inclusion criteria were: (1) subjects at the age of 20 to 45 years old and diagnosis of chronic periodontitis, according to the criteria established by the American Academy of Periodontology (AAP) [23] and (2) subjects with contra-lateral quadrants containing at least one molar with PPD  $\geq$  5 mm, CAL  $\geq$  6 mm and BOP. The exclusion criteria were: (1) systemic diseases; (2) need for antibiotic prophylaxis before periodontal treatment; (3) use of systemic antibiotics and controlled or continuous use drugs in the last 6 months; (4) pregnancy or active lactation; (5) allergy to DOX and periodontal dressing and (6) if they have received any surgical or non-surgical periodontal therapy for the last 6 months.

After analysis of the periodontograms, two molars were selected of each individual, in contralateral quadrants. No were included third molars and elements with furcation

and endo-periodontic lesion. In each molar, the measurements were had been made at four sites buccal, lingual, mesial and distal (B, L, M, D) and were selected the pockets of greater periodontal depth.

The sample size was calculated using a statistical software package\*and consisted of a minimum sample size of 24 individuals (8 per group), with a significance level of 5%. Considering the possibility of quitting individuals of 20%, 12 individuals were selected per group, totaling 36 individuals. One subject of GI and two of GIII gave up at T0. Thirty-three subjects were distributed, following simple randomization, in three independent groups: GI (10% DOX gel + SRP), GII (10% DOX included in  $\beta$ -CD gel + SRP), and GIII (SRP alone). They were evaluated at T0 - beginning of the study and first application of the gel, T1 - 30 days after T0 and the second application of the gel, T2 - 60 days after T0. The randomization resulted in similar average values for all the periodontal clinical parameters analyzed in all groups.

### **Periodontal procedures**

Initially, all subjects received oral hygiene instructions, including brushing technique and interdental cleaning. They participated in a plaque control, performed by coronary polishing with prophylactic paste and Robinson brush, until reach VPI of < 20 %. Subjects received verbal and written guidelines and maintain the self-standard oral hygiene.

The following periodontal clinical parameters were evaluated: PPD, CAL, and BOP, present or absent, was recorded 10 seconds after probing [26]. Visible plaque, present or absent [27]. After recording the clinical parameters, the SRP was

performed using hand instruments with the removal of supra and subgingival plaque and calculus. The procedure was performed to obtain smoothness on of the root surface.

The clinical and periodontal treatments of all subjects, in the three experimental periods, were performed by the same professional in the following sequence: VPI annotation; removal of supragingival biofilm and evaluation of clinical parameters: PPD, CAL, and BOP. At T0, SRP and the initial X rays (molar bitewing) were performed in all subjects, before the first gel application in GI and GII, on the two particular teeth per subject. At 30 days after the first application (T1), SRP was performed in all subjects and the second application of the gel in GI and GII. The SRP and X rays (molar bitewing) were performed in all subjects with 60 days (T2). After 18 months (T3), only the final X-rays were performed.

The tubes containing the gels (10% DOX and 10% DOX:  $\beta$ -cyclodextrin) were marked with strips of distinct colors, by an employee outside the study. Both were similar in color, smell and taste. The gel was placed, through a syringe, on the base of the periodontal pocket until the gingival margin. The excess of the gel was removed by a curette. Then, a light-cured resin dam was applied for sealing the gel into the pocket and it was polymerized for 40 seconds. The subjects were instructed to avoid hard or sticky foods, not to touch the area with tongue or finger, to maintain oral hygiene and to report in case of pain, swelling and any other adverse effects.

## **Radiographic analysis**

The digital interproximal images of the posterior region of maxilla and mandible of 33 individuals were performed at the Radiology Department of the UFMG School of Dentistry. The radiographs were performed by the same professional, using the technique of parallelism. No additional images were acquired. The final evaluation was done by two specialists, blind to the different treatments that analyzed the radiographic bone density by the fractal analysis method. Two rectangular regions of interest (ROIs) (90 x 30 pixels) were selected in two different areas of maxilla posterior interdental bone, not including root or periodontal space.

The size of the rectangular ROI was selected according to the sizes of the interdental bone to be analyzed, as previously related [28]. The average of the two ROIs was used to calculate the average Fractal Dimension (FD) for each subject, to discriminate the trabecular integrity alterations induced by periodontitis, by the box counting method, described by White and Rudolph [29, 30].

All image analysis was done using an imaging software system (ImageJ v.1.51j8 software, National Institutes of Health, Bethesda, MD). For this purpose, 200 ROIs were duplicated using the Gaussian filter blurred with a diameter of 35 pixels. After the subtracting of the blurred image from the original one, an image with an average gray value of 128 pixels was obtained at the end of this procedure.

## **Statistical analysis**

All data were analyzed using the program Statistical Package for Social Sciences, version 19.0 for Windows (SPSS, IBM, Armonk, NY). The comparison within each

group was determined by Analysis of Variance technique by Blocks (ANOVA). The level of significance was 5% ( $p < 0.05$ ). In the comparison among groups were performed by the  $t$  Test and the nonparametric Friedman Test, depending on the data distribution. Considering 3% ( $p < 0.003$ ). For non-numeric variables (BOP and VPI) were used Test Q-Square and Correspondence Analysis, 5% ( $p < 0.05$ ). In the radiographic analysis, the mean of the two ROIs was used to calculate mean FD for each participant over time. ANOVA was used for the comparison of the FDs of the groups ( $p < 0.05$ ).

## Results

The participants were followed up to 18 months after the baseline. This study evaluated 33 subjects with CP, 9 men (27 %) and 24 (73 %) women. A total of 264 sites (33 subjects  $\times$  2 teeth  $\times$  4 sites (B, L, M, D) were evaluated: 88 of the GI, 96 of the GII and 80 of the GIII. The characteristics of the patient sample that completed the study are in Table 1. The parameters were analyzed by the arithmetic mean of the sites of both teeth selected for each subject, in each time, for comparison of treatments: GI - SRP + 10% DOX GEL; GII - SRP + 10% DOX/ $\beta$ -CD GEL and GIII - SRP. At baseline (T0), the mean of clinical parameters investigated was similar among the groups indicating that the randomization process was effective. No adverse reaction to treatments was reported.

**Table 1.** Epidemiological characteristics of the patients and mean of the initial PPD and CAL in accord with protocol analysis.

Groups	GI	GII	GIII
	10% DOX gel	10% DOX / $\beta$ -CD gel	SRP
<b>NSubjects 33</b>	11	12	10
<b>N Sites 264</b>	88	96	80
<b>Age (years)</b>	20/42	35/43	37/45
<b>Gender (male/female)</b>	1/10	5/12	3/10
<b>Initial PPD (mm)</b>	4.70 $\pm$ 1.29	5.11 $\pm$ 0.71	4.88 $\pm$ 0.77
<b>Initial CAL (mm)</b>	6.13 $\pm$ 0.99	6.09 $\pm$ 0.67	6.0 $\pm$ 0.67

### Periodontal probing depth

The values obtained after the periodontal probing depth (mm) of each group examined at T0, baseline, one month (T1 - 30 days) and two months (T2 - 60 days) after therapy are shown Table 2. At T0, the PPDs of the three groups (GI, GII, and GIII) presented similar values on average 4.8 mm. After the first application (T1), the mean reduction of the PPD groups was 3.75 mm and after the second (T2), it was 3.16 mm. In the comparison within each group, GI and GII presented a statistically significant reduction, after the first and the second application ( $p < 0.05$ ). In the comparison among groups, considering the mean differences ( $\Delta$  T0 - T2), all T2 values decreased in relation to T0 ( $p < 0.003$ ). GII, the group treated with SRP + 10%

DOX /  $\beta$ -CD GEL, had the largest statistically significant reduction among groups of  $2.62 \text{ mm} \pm 0.31 \text{ mm}$  ( $p < 0.003$ ) and within each group ( $p < 0.05$ ). It was concluded that the reapplication of DOX gels contributed to the final result in PPD reduction for GI and GII (Table 2).

The evaluations of the reduction of PPD values obtained by sites expressed as percentages according to categories: 4, 4 to  $\leq 6$  and  $> 6$  mm are set out in Table 3. Initially, 44% of the pockets were 4 mm (shallow), with 4 to  $\leq 6$  mm were 42% and the deepest pockets were 10% (GIII), 14% (GI) and 20% (GII). After 60 days, there was a drastic reduction of periodontal pockets, showing a marked improvement, reaching shallower pockets 93%, 97% and 73% for GI, GII, and GIII, respectively ( $p < 0.003$ ). From the clinical point of view, this result translates into periodontal health for subjects.

**Table 2.** Comparison of PPD within each group and among groups of 10% DOX gel and scaling and root planning (SRP) (GI), 10% DOX:  $\beta$ -cyclodextrin gel and SRP (GII) and SRP alone (GIII), at different time intervals: T0 (Baseline), T1 (30 days), T2 (60 days).

Clinical Parameter	GI 10% DOX gel	GII 10% DOX / $\beta$ -CD	GIII SRP
<b>Periodontal Probing</b>			
<b>Depth (PPD)</b>			
T0 (Baseline)	4.70 $\pm$ 1.29	5.11 $\pm$ 0.71	4.88 $\pm$ 0.77
T1 (30 days)	3.76 $\pm$ 0.9*	3.18 $\pm$ 0.63*	4.40 $\pm$ 0.4
T2 (60 days)	3.18 $\pm$ 0.72	2.49 $\pm$ 0.4	3.81 $\pm$ 0.46
$\Delta$ T0-T2	1.52 $\pm$ 0.77*	2.62 $\pm$ 0.31**	1.07 $\pm$ 0.31*
<b>Clinical Attachment</b>			
<b>Level (CAL)</b>			
T0 (baseline)	6.13 $\pm$ 0.99	6.09 $\pm$ 0.67	6.00 $\pm$ 0.67
T1 (30 days)	5.19 $\pm$ 0.7*	4.25 $\pm$ 0.73*	5.51 $\pm$ 0.58
T2 (60 days)	4.61 $\pm$ 0.63	3.55 $\pm$ 0.67*	4.95 $\pm$ 0.58
$\Delta$ T0-T2	1.52 $\pm$ 0.36**	2.54**	1.05 $\pm$ 0.09*
<b>Bleeding on probing</b>			
<b>(BOP)</b>			
T0	91	92	90
T1	59	50	55
T2	11	8	15
$\Delta$ T0-T2	80*	84*	75*
<b>Visible plaque index</b>			
<b>(VPI)</b>			
T0	77	79	80
T1	14	13	10
T2	6	8	5
$\Delta$ T0-T2	71*	71*	75*

\*Significance within each group (p <0.05) and \*\*among the groups (p <0.003).

**Table 3.** Reduction values obtained of periodontal probing depth (PPD) and evaluation by sites and percentage according to PPD categories after treatment with 10% DOX gel and scaling and root planning (SRP) (GI), 10% DOX:β-cyclodextrin gel and SRP (GII) and SRP alone (GIII), at T0 (Baseline), T1 (30 days), T2 (60 days) ( $p < 0.003$ ).

Periodontal Probing Depth (PPD)	Percentage of number of sites analyzed								
	GI			GII			GIII		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
4 mm	54	78	93	43	83	97	37	50	73
4 to ≤ 6 mm	32	17	5	37	14	2	52	50	26
> 6 mm	14	4	1	20	2	0	10	0	0
<b>Number of Sites</b>	88	88	88	96	96	96	80	80	80

### Clinical attachment level

The mean of CAL (mm) obtained of each group is shown in Table 2. At T0, the values of the CALs of the groups were similar on average 6.07 mm. After the first application (T1), the mean gain of the clinical insertion of the groups was 4.98 mm and after the second (T2), it was 4.37 mm. In the comparison within each group, GII presented statistically significant gain, after the first and the second application, while GI, only after the first ( $p < 0.05$ ). When the comparison was made among the groups, considering ( $\Delta T0 - T2$ ), GII presented the highest average gain of CAL (2.54 mm) in

relation to GIII ( $p < 0.003$ ). Thus, reapplication of the DOX gels contributed to the final result of the GI and GII insertion gain (Table 2).

Higher differences were found when CAL gain was assessed by sites expressed as a percentage of PPD (4, 4 to  $\leq$  6,  $>$  6) (Table 4). At T0, the category of (4 mm) had an average of 7% for GI and GIII and 4% for GII. All groups had the highest number of sites in the category (4 to  $\leq$  6 mm). At T2, a significant number of sites went from deep pockets to shallow (4 mm), showed the highest average of 49% for GI, 85% for GII and 32% for GIII ( $p < 0.003$ ).

**Table 4.** Gain values obtained from CAL and evaluation by sites expressed as a percentage according to categories after treatment with 10% DOX gel and scaling and root planning (SRP) (G1), 10% DOX: $\beta$ -cyclodextrin gel and SRP (GII) and SRP alone (GIII) ( $p < 0.003$ ).

Clinical Attachment Level (CAL)	Values expressed as percentage from number of sites analyzed								
	GI			GII			GIII		
mm	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
4	7	24	49	4	57	85	7	16	32
4to $\leq$ 6	65	65	49	71	39	17	55	72	61
$>$ 6	28	11	2	25	3	1	37	11	6
<b>Number of Sites</b>	88	88	88	96	96	96	80	80	80

### **Bleeding on probing**

In Table 2 are the data of the mean BOP (expressed as a percentage) of each group, in the three phases of evaluation. At baseline (T0) the averages of the BOP groups were similar. In comparison within each group and considering ( $\Delta$  T0 - T2), BOP had a strong reduction for all groups ( $p < 0.05$ ), but the GII showed the greatest average reduction (84%) ( $p < 0.05$ ). Comparing the groups, BOP decreased in a similar way for all protocols analyzed without significant difference. It was decreased 2 times for all groups after the first application (T1) and after the second application (T2), decreasing 5, 6 and 4 times respectively. This means that the largest reductions for all groups occurred after the second application. When BOP was evaluated by sites, were observed the higher differences.

The BOP positive response by sites was expressed as a percentage in Table 5. At T1 it decreased 2, 4 and 2 times for GI, GII, and GII, respectively. At T2, it decreased 3, 16 and 2 times, respectively. This meaning that, the reductions at T2 for GI and GIII were the same. However, the reduction of GII, at T2, was 16 times greater, representing 61%.

**Table 5.** Bleeding on probing (BOP) positive response of the subjects treated with scaling and root planning (SRP) + 10% DOX GEL (GI), 10% DOX/  $\beta$ -cyclodextrin + SRP GEL (GII) and SRP (GIII), according to values at baseline (T0), 30 days (T1) and 60 days (T2), as well as mean of alterations by sites expressed as percentage.

Bleeding on probing (BOP)	G I			GII			G III		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
<b>RESPONSE</b>									
<b>Positive</b>	45	23	7	62	16	1	61	30	14
<b><math>\Delta</math> T0-T2</b>	38			61**			47		
<b>Number of sites</b>	n = 88			n = 96			n = 80		

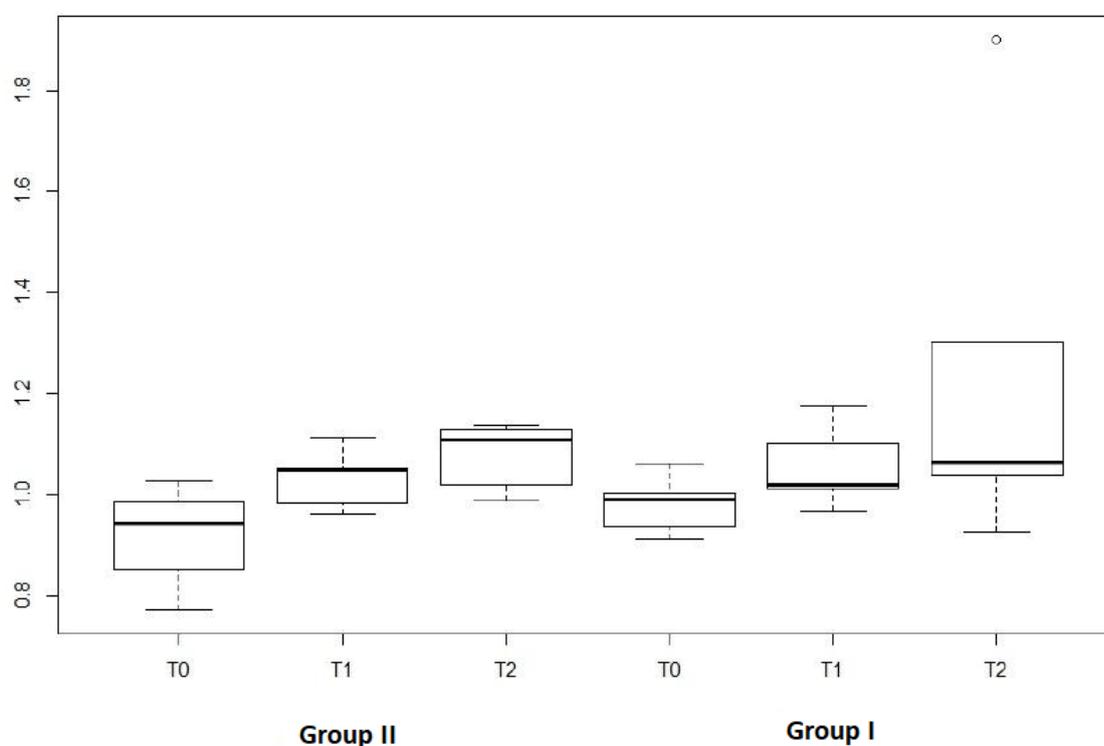
\*\*Significance within each group ( $p < 0.05$ )

### Visible plaque index

In Table 2 are the data of the mean VPI (%) of each protocol (SRP + 10% DOXGEL; SRP + 10% DOX /  $\beta$ -CD GEL and SRP only), at three times of evaluation. In comparison within each group and considering the differences of ( $\Delta$  T0 - T2), VPI had a strong reduction for all groups evaluated ( $p < 0.05$ ), decreasing 5, 6 and 8 times for GI, GII and GIII respectively, at T1 and at T2, decreased twice for all groups. This meaning that, the greatest reductions occurred at T1, for all groups. Comparing the groups, there was no significant association between the groups in relation this parameter, but GIII had the highest average reduction of VPI (75%).

## Radiographic Density

The comparative evaluation of the bone densities obtained in the radiographic examinations of GI and GII are represented in Figure 1. It was observed the increase in bone density over time in both groups. However, GII showed a statistically significant increase in bone density between T0 and T2 times, but there was no significant difference in relation to the type of gel applied.



**Figure 1.** Boxplot of evaluation of measurements of bone densities obtained from radiographic of the subjects treated, between group, Scaling and Root Planning (SRP) + 10% DOX gel (GI) and SRP + 10% DOX/  $\beta$ -cyclodextrin gel (GII), at T0 (initial RX), T2 (RX 60 days after T0) and T Final (RX 18 months after T0).

## Discussion

Decreasing in PPD and gain of CAL are the main clinical results to determine the success of any periodontal treatment [31]. Any additional reduction in the periodontal pocket and gain of insertion, after administration of the drug, represents a real clinical benefit and may reduce the need for additional periodontal surgery. In addition, during periodontal maintenance therapy, one should try to prevent recurrence of periodontitis [9] and according to Jain et al. [32] the prolonged delivery of antibacterial agents can avoid recolonization after SRP.

In the present study, at 60 days (T2), all PPD values decreased in relation to T0 ( $p < 0.05$ ). GII, the group treated with SRP + 10% DOX /  $\beta$ -CD GEL, presented the largest reduction between the groups, statistically significant ( $p < 0.003$ ). GI and GII presented a statistically significant reduction, after the first 30 days and after the second application, in T2 ( $p < 0.05$ ). The reapplication of DOX gels contributed to the final result in PPD reduction, especially for GII (Table 2). Initially, the most of the pockets were 4 mm (shallow) and 4 a  $\leq$  6 mm. After 60 days, there was a drastic reduction of the periodontal pockets reaching superficial pockets ( $p < 0.003$ ) (Table 3). As in the present study, Mendes et al. [18] also had a reduction of pockets deeper, 7 to 8 mm, up to 4 mm, with the gain of tissue insertion, substantially improving the quality of life of individuals with periodontitis.

In the present study, there was a significant increase in CAL in the groups. However, the clinical parameters in the experimental groups presented better results in relation to the control group. The 10% DOX gel promoted insertion gain of 4% for the SRP group and 6% for the test group. However, in the present study, GII presented the highest mean gain ( $\Delta T0 - T2$ ), representing 42%, GI obtained 25%, GIII, 17% ( $p$

<0.003). These results demonstrate that the reapplication of DOX gels contributed to the final result in GI and GII insertion gain, especially for GII (Table 2). CAL gains were best observed by site, the pockets were shallower at T2 ( $p < 0.003$ ) (Table 4). This result is in agreement with Javali & Vandana [33] and Ahamed et al. [34]. Jacomazzi et al. [35] didn't find a statistically significant difference, in PPD and CAL, after 180 days. Clinical results showed reduced PPD during the first 60 days and CAL gains only in the first 30 days. They concluded that presented better clinical response in the SRP-treated sites associated with the 10% DOX gel. However, here there was showed greater reductions in PPDs and CAL gains, especially those obtained with 10% DOX /  $\beta$ -CD gel, than other studies with a similar design and longer evaluation time [36, 37].

Bleeding on probing points to the success or the failure in periodontal treatment, because reveals the presence of inflammation of the pocket [38]. In the present study, BOP decreased considerably and similarly in all groups, but without significant difference. The highest reductions occurred after the second application (T2) ( $p < 0.05$ ) (Table 2). GII had the highest mean reduction (84%) and by sites, was 16 times higher in T2 ( $p < 0.05$ ) (Table 5). One possible reason for this better result is that the inclusion of DOX in  $\beta$ -CD may have prolonged the anti-inflammatory local effect of DOX, decreased the inflammatory markers, such as prostaglandin and MMPs, modulating the host response. DOX has been efficient in restricting these enzymes in minimal doses without developing bacterial resistance, for this reason, it is considered the most potent inhibitor of MMPs. Studies also reported substantial reductions in BOP and concluded that adjunct treatment is more effective compared to mechanics alone [39,40].

VPI presented a strong reduction in all groups ( $p < 0.05$ ) (Table 2). The GIII (SRP) presented the highest mean reduction (75%), but without significant difference. These results corroborate with Wennstrom et al. [41] and Javali & Vandana [33]. These authors attributed the improvements observed to BOP and VPI to the adequate maintenance of oral hygiene. In addition, coronary polishing was performed to remove the supragingival biofilm, before each collection of clinical parameters. According to Deo et al. [42], it is well established that the organization of the supragingival biofilm may block the distribution of the drug and inactivate the pharmacological action. Thus, the removal of this biofilm before to the gel application could promote greater DOX efficacy.

DOX concentrates on tissues, including the bone microenvironment, and also has an osteogenic effect. For these reasons, it has been used in the treatment of bone diseases [5,8,10]. In the present study, the evaluation of bone density in the GI and GII radiography performed at T0 (initial RX), T2 (RX 60 days) and T3 (RX 18 months) shows an increase in bone density, over time, in all groups, with no significant difference between them. However, GII showed a statistically significant increase in bone density between T0 and T2. They associated increased proliferation of osteoblasts with DOX /  $\beta$ CD compared to free DOX. Agarwal and Gupta [43] also found no significant difference in the periodontal repair of the infra-bony defects between the groups treated with or without free DOX, both groups showed significant improvements in the parameters. However, better results were obtained in the DOX-treated group, there were greater bone density and less crest resorption.

Previous studies have also shown that the therapeutic use of this tetracycline at low concentrations acts as a promoter of the proliferation of osteoblastic cells [44]. The

results of Park et al. [5] showed that when preosteoblasts were cultured in the presence of 10% DOX, there was an increase in alkaline phosphatase activity and resulted in increased calcium and mineral deposits.

It can be inferred that the possible reasons for better results of this study were the reapplication of the gels and the inclusion of DOX in  $\beta$ CD. Soskolone [45] showed that the frequency and time of contact with the subgingival microbiota is important because the increased turnover of the crevicular fluid in the periodontitis facilitates the faster diffusion of the drug from the gels, unless they become more viscous and less susceptible to hydrolysis [15].

## **Conclusions**

In this study the gel showed double slow delivery systems of DOX, and inclusion compound with  $\beta$ CD. Through the local delivery of DOX it is possible to increase and to prolong the local action of the active principle [3,14]. In addition, the anti-inflammatory effects of DOX may promote increased the bone density. The best results after the second application reinforce the need for the presence of the drug at the target site for longer. The 10% DOX included in  $\beta$ -CD gel associated with SRP showed a significant improvement in periodontal clinical parameters (PPD, CAL, and BOP) and VPI, providing additional benefits to the SRP alone. There was an increase in the bone density over time in all groups. The inclusion of doxycycline into  $\beta$ -CD locally released may be an important chemotherapeutic adjuvant in the treatment of chronic periodontitis.

## Conflicts Of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This study was partially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES), Brazil, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Brazil, the State of Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG).

## References

1. Drisko CL. Periodontal debridement: still the treatment of choice. *J Evid Base Dent Pract* 2014;14:33-41.
2. Arweiler NB, Pietruska M, Pietruski J, et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Invest* 2014;1–7. Epub ahead of print.
3. Jepsen K & Jepsen S. Antibiotics/Antimicrobials: Systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontology 2000* 2016;71:82–112.DOI: 10.1111/prd.1212.
4. Nickles K, Scharf S, Rollke, L, Dannewitz B, Eickholz P. Comparison of Two Different Sampling Methods for Subgingival Plaque: Subgingival Paper Points or Mouthrinse Sample? *J Periodontol*2017;88(4): 399-406.
5. Park JB. Effects of doxycycline, minocycline and tetracycline on cell proliferation, differentiation and protein expression in osteoprecursor cells. *J Craniofac Surg* 2011;22:1839–1842.
6. Choi SJ, Han JH, Roodman GD. ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. *J. Bone Miner Res* 2000;16:814-822.
7. Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biology* 2010;29(3):194-201.

8. Khandan A, Ozada N, Karamia E. Novel microstructure mechanical activated nanocomposites for tissue engineering applications. *J Bioeng Biomed Sci*2015; 5:143.
9. Ioannou I, Dimitriadis N, Papadimitriou K, Vouros I, Sakellari D, Konstantinidis A. The Effect of Locally Delivered Doxycycline in the Treatment of Chronic Periodontitis. A Clinical and Microbiological Cohort Study. *J Oral Maxillofac Res* 2010;1(4):1.
10. Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, Di Franco JM, Hardman JH, et al. CORE: a phylogenetically curated. 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS ONE* 6 2011: e19051.
11. Holmes SG, Still K, Buttle DJ, Bishop NJ, Grabowski PS. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. *Bone* 2004;35(2):471-478.
12. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Dendrimer – a novel scaffold for drug delivery. *Int J PharmaSci Rev Res* 2011;7:211–20.
13. Sandhya YP, VenkateshPrabhuji ML, Chandra, RV. Comparative Evaluation of the Efficacy of 10% Doxycycline Hyclate in the Periodontal Treatment of Smokers – A Clinical and Microbiological Study. *Oral Health Prev Dent* 2011;9:59-65.
14. Uskokovic V. Nanostructured platforms for the sustained and local delivery of antibiotics in the treatment of osteomyelitis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*2015;32(1):1–59.
15. Mombelli A, Samaranayake LP. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *Int Dent J* 2004;54(1):3-14.
16. Pattnaik S, Panigrahi L, Murthy RSR, et al. Periodontal muco-adhesive formulations for the treatment of infectious periodontal diseases. *Curr Drug Deliv*2007;4:306–323
17. Gupta R, Pandit N, Aggarwal S, Verma A. Comparative evaluation of subgingivally delivered 10% doxycycline hyclate and xanthan-based chlorhexidine gels in the treatment of chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract*2008;9(7):25-32.
18. Mendes AB, Fittipaldi JA, Neves RC, Chacra AR, Moreira ED Jr. Prevalence and correlates of glycemic control: results from a nationwide survey of 6,671 adults with diabetes in Brasil. *Acta Diabetol*2010;47(2):137-145.
19. Moura LA, Ribeiro FV, Aiello TB, et al. Characterization of the release profile of doxycycline by PLGA microspheres adjunct to non-surgical periodontal therapy. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2015;26(10):573–584.

20. Garrett S, Adams DF, Bogle G, Donly K, Drisko CH, Hallmon WW, et al. The effect of locally delivered controlled-release doxycycline or scaling and root planing on periodontal maintenance patients over 9 months. *J Periodontol* 2000;71(1):22-30.
21. Yang R, Chen JB, Xiao CF, et al. Inclusion complex of GA-13316 with beta-cyclodextrin: preparation, characterization, molecular modeling, and in vitro evaluation. *Carbohydrate Polymers* 2014;111:655–662.
22. Jervoe-Storm PM, Funke G, Nolden R. Is subgingival antimicrobial support to mechanical root planing necessary? *J Dent Res* 1996;75:425.
23. American Academy of Periodontology Task Force Report on the update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2015; 86:835–838.
24. Pataro AL, Franco CF, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine *Biomaterials* 2003;24:1075-80.
25. Cortés, M.E., Pataro, A.L., Sinisterra, R.D., Araujo, M.V. (2002). Processo de preparação de composições farmacêuticas de antimicrobianos, anestésicos e anti-inflamatórios para a liberação lenta e produtos derivados Brasil. PI 0206336-0. 09/12/2002.
26. Ainamo J & Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal* 1975;25(4):229-235.
27. Silness J & Løe H. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121-135.
28. Sener E, Cinarcik S, Baksi BG. Use of fractal analysis for the discrimination of trabecular changes between individuals with healthy gingiva or moderate periodontitis. *J Periodontol* 2015; 86:1364-1369. doi: 10.1902/jop.2015.150004.
29. White SC, Rudolph DJ. Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:628-635.
30. Sindeaux R, Figueiredo PT, de Melo NS, et al. Fractal dimension and mandibular cortical width in normal and osteoporotic men and women. *Maturitas* 2014;77:142- 148.
31. Priyanka N, Kalra N, Saquib S, Kudyar N, Malgaonkar N, Jain H, et al. Clinical and microbiological efficacy of 3% satranidazole gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: A randomized, controlled clinical trial. *Contemp Clin Dent* 2015;6:364-70.

32. Jain N, Jain GK, Javed S, et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discov Today* 2008;13:932–43.
33. Javali MA, Vandana K.L. A comparative evaluation of atrigel delivery system (10% doxycycline hyclate) Atridox with scaling and root planning and combination therapy in treatment of periodontitis: A clinical study. *J Indian SocPeriodontol* 2012;16:43-8.
34. Ahamed S, Jalaluddin M, Khalid I, Moon N, Shaf TK, Ali FM. The use of controlled release locally delivered 10% doxycycline hyclate gel as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: clinical and microbiological results. *J Contemp dent pract* 2013;14(6):1080-6.
35. Jacomazzi AM, Oliveira e Silva C, Lima AFM. Clinical evaluation of 10% doxycycline hyclate application in non-responsive periodontal sites. *R. Periodontia* 2006;16(4):28-33.
36. Gurkan A, Emingil G, Çınarcık SC, Berdeli A. Post-treatment effects of sub-antimicrobial dose doxycycline on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor- $\beta$ 1 in severe, generalized chronic periodontitis. *Int J Dent Hygiene* 2008;6:84–92.
37. Eickholz P, Kim TS, Burklin J, Schache B, Renggli HH. Non-surgical periodontal therapy with adjunctive topical doxycycline: A double blind randomized controlled multicenter study. (I) study design and clinical results. *J Clin Periodontol* 2002;29:108-17.
38. Matuliene G, Pjetursson BE, Salvi GE, et al. Influence of residual pockets on the progression of periodontitis and tooth loss: Results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol* 2008;35:685-695.
39. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8(1):12-37.
40. Emingil G, Gurkan A, Atilla G, Berdeli A, Cınarcık S. Adjunctive low-dose doxycycline therapy effect on clinical parameters and gingival crevicular fluid tissue plasminogen activator levels in chronic periodontitis. *Inflamm Res* 2006;55:437-43.
41. Wennstrom JL, Newman HN, MacNeill SR, Killoy WJ, Griffiths GS, Gillam, DG, et al. Utilization of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis, a comparative multicenter trial of two treatment approaches. *J Clin Periodontol* 2001;28:753-61.

42. Deo V, Ansari S, Mandia S, Bhongade M. Therapeutic Efficacy of Subgingivally Delivered Doxycycline Hyclate as an Adjunct to Non-surgical Treatment of Chronic Periodontitis. *J Buccal Maxillofac Res* 2011;2:1.
43. Agarwal A, Gupta ND. Combination of bone allograft, barrier membrane and doxycycline in the treatment of infrabony periodontal defects: A comparative trial. *The Saudi Dental Journal* 2015; 27:155–160
44. Gomes PS, Fernandes MH. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. *Arch Oral Biol* 2007;52:251.
45. Soskolne WA. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:164–74.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A periodontite afeta a maioria da população mundial. De acordo com a OMS, cerca de 10% a 15% sofre de periodontite grave, sendo a maior causa da perda de dente após os 25 anos de idade (JACOB, 2012). É uma das doenças crônicas mais prevalentes no mundo e está associada a outras comorbidades sistêmicas (ZILBERMAN e ELSNER, 2008).

Segundo um estudo epidemiológico de âmbito nacional, a SB BRASIL 2010 - Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012), cerca de 80% dos brasileiros adultos (35 e 44 anos) apresentam alta prevalência da doença e, conseqüentemente, de ausência de elementos dentais, associada também aos acometimentos endodônticos e /ou endoperiodontais. A maioria dos indivíduos da população brasileira apresenta algum tipo de edentulismo, seja unitário, parcial ou total. O levantamento mostrou que 68,8% dos adultos e 92,7% dos idosos (65 e 74 anos) necessitam de algum tipo de prótese dentária. À medida que ocorre a perda dentária, ocorre também maior comprometimento da função mastigatória. A população idosa pode apresentar até um sexto da dentição natural (MISCH, 2009).

Estes dados refletem um importante impacto clínico e de qualidade de vida para o indivíduo e em importante impacto financeiro às políticas de saúde pública, principalmente, porque o Brasil caminha para se tornar um país de população majoritariamente idosa, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

O tratamento mecânico não cirúrgico, considerado padrão-ouro, apresenta limitações. Um grande número de indivíduos apresenta dificuldade de controle da doença e de higienização bucal adequada. Além disso, existem dificuldades técnicas de acesso às bolsas mais profundas (KINANE et al., 2011). Portanto, tornou-se de grande relevância o desenvolvimento de novas pesquisas que objetivem tratamentos da periodontite cada vez mais eficazes.

A literatura demonstra a eficácia e vantagens de sistemas de liberação local de antimicrobianos adjuntos aos tratamentos tradicionais em indivíduos acometidos

por periodontite (JEPSEN e JEPSEN, 2016). A DOX, nestes sistemas, demonstrou bons resultados clínicos e microbiológicos (JAVALI e VANDANA, 2012, MOURA et al., 2015). Este trabalho fundamentou-se no desenvolvimento de um novo gel de liberação controlada, que possibilitasse prolongar os efeitos terapêuticos da DOX, promovesse o reparo de defeitos ósseos e melhorasse os parâmetros clínicos de bolsas periodontais em indivíduos com periodontite crônica.

O presente estudo mostrou que a aplicação do gel da DOX a 10%, incluída em  $\beta$ -CD, associada à RAR apresentou melhora significativa nos parâmetros clínicos periodontais (PSP, NIC e SS) e do IPV, em todos os protocolos analisados, proporcionando benefícios adicionais à RAR sozinha. O gel contendo somente DOX a 10% também apresentou benefícios significativos à RAR sozinha, porém menores se comparado ao gel com o composto de inclusão (DOX/  $\beta$ -CD). Pode-se sugerir que o composto de inclusão e a reaplicação dos géis promoveram diferenças nos resultados. Os indivíduos tratados passaram para bolsas periodontais mais rasas ao final da investigação. Do ponto de vista clínico, este resultado traduz-se em ganho real da saúde periodontal. Neste ensaio clínico não houve relatos dos pacientes sobre reações adversas, sabor desagradável ou qualquer desconforto durante o uso dos géis. Portanto, o gel com o composto de inclusão de doxiciclina em  $\beta$ -CD, liberada localmente, pode ser um adjuvante quimioterapêutico importante no tratamento da periodontite e dessa forma, colaborar para a melhora do quadro sócio-epidemiológico da periodontite no Brasil.

Além disso, como a intervenção foi implementada para ambos os sexos, de grande faixa etária, em diferentes níveis de PSP e NIC, e incluindo grupos tratados e não tratados, um amplo espectro da lesão foi coberto. Os resultados indicam que outras pessoas com PC poderiam se beneficiar do uso adjuvante do gel de DOX incluída em  $\beta$ -CD.

Apesar dos resultados observados, linhas de pesquisas futuras e sistemas de liberação local de antimicrobianos adjuntos aos tratamentos tradicionais podem ser desenvolvidos com acompanhamento longitudinal. No intuito de reduzir o impacto das sequelas da periodontite, melhorando o bem-estar físico, psicológico e social dos indivíduos portadores de periodontite crônica. Através desses estudos, o

conhecimento científico produzido pode ser aplicado em benefício da sociedade, sendo este um dos objetivos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ressalta-se ainda que as estratégias de promoção à saúde e educação preventiva como instruções de higiene oral, dieta equilibrada e hábitos de vida mais saudáveis corroboram para a melhoria da saúde, não apenas bucal, mas também da saúde geral do indivíduo.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ABOU-RAYA, S.; NAEEM, A.; ABOU-EL KHEIR, H.; EL BELTAGY, S. Coronary artery disease and periodontal disease: is there a link? **Angiology**, v. 53, p. 141-148, 2002.

ADDY M, HASSAN H, MORAN J, WADE W, NEWCOMBE R. Use of antimicrobial containing acrylic strips in the treatment of chronic periodontal disease. A three month follow-up study. **J Periodontol**. 1988 Sep;59(9):557-64.

ADDY M, LANGEROUDI M. Comparison of the immediate effects on the subgingival microbiota of acrylic strips containing 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline. **J Clin Periodontol**. 1984 Jul;11(6):379-86.

AGNIHOTRI R, S. GAUR. Chemically modified tetracyclines: novel therapeutic agents in the management of chronic periodontitis, *Indian J. Pharmacol.* 44 (2012) 161–167.

AHUJA A, BAIJU C, AHUJA V. Role of antibiotics in generalized aggressive periodontitis: a review of clinical trials in humans. *J Indian Soc Periodontol*. 2012; 16: 317–23.

AINAMO J, BAY I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal*. 1975; 25 (4): 229-235.

AKALIN FA, BALTACIOGLU E, SENGÜN D, HEKIMOGLU S, TASKIN M, ETIKAN I, et al. A comparative evaluation of the clinical effects of systemic and local doxycycline in the treatment of chronic periodontitis. **J Oral Sci**. 2004 Mar;46(1):25-35.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4:1-6. PMID:10863370. <http://dx.doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>

AN WINKELHOFF, A. J., RAMS, T. E.; SLOTS, J. (1996) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology* 2000 10, 45–78.

ARMITAGE GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 1-6.

ARWEILER NB, PIETRUSKA M, PIETRUSKI J, et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Invest*. 2014: 1–7. Epub ahead of print.

BETTANY JT, PEET NM, WOLOWACZ RG, SKERRY TM, GRABOWSKI PS. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**. 2000 Jul;27(1):75-80.

biofilm. **Oral Microbiol Immunol**. 2006 Dec;21(6):366-71.

BONITO AJ, LUX L, LOHR KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol* 2005;76:1227-36.

BOSTANCI N et al. Effects of low-dose doxycycline on cytokine secretion in human monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Cytokine* 56 (2011) 656–661.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: Pesquisa nacional de saúde bucal. SB Brasil 2010. Resultados Principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. 92p. [cited 2016 April 26]. Available from: [http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto\\_sb2010\\_relatorio\\_final.pdf](http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf). Portuguese.

CARGILL KL, PYLE BH, SAUER RL, MCFETERS GA. Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol*. 1992 May;38(5):423-9. Erratum in: *Can J Microbiol* 1992 Oct;38(10):1089. [Medline: [1643585](#)] [doi: [10.1139/m92-071](#)].

CASARIN RC et al. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2010;45:635–42.

CASTRO, M. M., RIZZI, E., PRADO, C. M., ROSSI, M. A., TANUS-SANTOS, J. E., E GERLACH, R. F. (2010). Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biology*, 29(3), 194-201.

CHADHA, V. S. E BHAT, K. M. (2012). The evaluation of doxycycline controlled release gel versus doxycycline controlled release implant in the management of periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 16, 200-6.

CHEKIROU N, BENOMRANE I, LEBSIR F, KRALLAFA A. Theoretical and experimental study of the tetracain/  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2012; 74: 211–221.

CHOPRA I, ROBERTS M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications,

CIANCIO SG. Site specific delivery of antimicrobial agents for periodontal disease. *Gen Dent*. 1999 Mar-Apr;47(2):172-8, 181.

CORTELLI JR, AQUINO DR, CORTELLI SC, ROMAN-TORRES CV, FRANCO GC,

CORTÉS ME, inventor; Universidade Federal de Minas Gerais, assignee. Process of preparation of gels. Brasil patent BR PI0405347-8. 2004

CORTÉS ME, SINISTERRA RD, ÁVILA-CAMPOS MJ, TORTAMANO N, ROCHA R G .The chlorhexidine: beta-ciclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. *J Inclusion Phen Macrocylic Chem*. 2001;40:297-302.

CORTÉS, M.E., PATARO, A.L., SINISTERRA, R.D., ARAUJO, M.V. (2002). Processo de preparação de composições farmacêuticas de antimicrobianos, anestésicos e anti-inflamatórios para a liberação lenta e produtos derivados Brasil. PI0206336-0. 09/12/2002.

CUNHA BA, SIBLEY CM, RISTUCCIA AM. Doxycycline. *Ther Drug Monit*. 1982;4(2);115-35.

DASANAYAKE, A.P.; BOYD, D.; MADIANOS, P.N.; OFFENBACHER, S.; HILLS, E. The association between *Porphyromonas gingivalis*-specific maternal serum IgG and low birth weight. *J. Periodontol.*, v. 72; p. 1491-1497, 2001.

DEL VALLE, EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004; 39: 1033–1046.

DENIC MS., SLAVICA M. SUNARIC,, LJILJANA G. KESIC, IVAN Z. MINIC, RADMILA R. OBRADOVIC, MARIJA S. DENIC, MILICA S. PETROVIC. RP-HPLC assay of doxycycline in human saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontal disease *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78–79 (2013) 170– 175.

DINIZ HF. Nanoagregados baseados em ciclodextrinas em associação com a tetraciclina: caracterização físico-química e avaliação antimicrobiana. [Tese de Mestrado]. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG; 2007.

DRAENERT F, MÜLLER WEG, FENG Q, SCHRÖDER HC, WANG X. The Deep-Sea Natural Products, Biogenic Polyphosphate (Bio-PolyP) and Biogenic Silica (Bio-Silica), as Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Fabrication of a Morphogenetically-Active Polymer. *Marine Drugs*. 2013; 11(3): 718-746. doi 10.3390/md11030718

DRISKO CL. Periodontal debridement: still the treatment of choice. *J Evid Base Dent Pract*. 2014;14: 33-41.

EICK, S., SELTMANN, T. & PFISTER, W. (2002) Antibiotika und parodontalpathogene Bakteriesspezies im Biofilm – eine In-vitro-Studie. *Dtsch Zahnärztl Z* 57, 289–294.

EICKHOLZ P, KIM TS, BURKLIN J, SCHACHER B, RENGGLI HH. Non surgical periodontal therapy with adjunctive topical doxycycline: A double blind randomized controlled multicenter study. (I) study design and clinical results. *J Clin Periodontol* 2002;29:108-17.

EICKHOLZ P, KIM TS, SCHACHER B, REITMEIR P, BÜRKLIN T, RATKA-KRÜGER P. Subgingival topical doxycycline versus mechanical debridement for supportive periodontal therapy: a single blind randomized controlled two-center study. **Am J Dent**. 2005 Dec;18(6):341-6.

EMINGIL, GU'RKAN, ATILLA, KANTARCI. Subantimicrobial-Dose Doxycycline and Cytokine-Chemokine Levels in Gingival Crevicular Fluid *J Periodontol*

ESFAHANIAN V, SHAMAMI MS, SHAMAMI MS. Relationship between osteoporosis and periodontal disease: review of the literature. *J Dent (Tehran, Iran)*. 2012; 9:256–64.

FERES M, HAFFAJEE AD, GONCALVES C, ALLARD KA, SOM S, SMITH C, et al. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. **J Clin Periodontol.** 1999 Dec;26(12):784-92.

FINKELMAN RD, POLSON AM. Evidence-based considerations for the clinical use of locally delivered, controlled-release antimicrobials in periodontal therapy. *J Dent Hyg.* 2013; 87: 249–264.

FIVES-TAYLOR P, MEYER D, MINTHZ K. Virulence factors of the periodontopathogen *A. actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* 1996; 67 (Suppl.):291-7. PMID:12654101.

FONG KP, CHUNG WO, LAMONT RJ, DEMUTH DR. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect Immun.* 2001; 69:7625-34. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.12.7625-7634.2001>.

FONTANAY S, KEDZIEREWICZ F, DUVAL RE, CLAROT I. Physicochemical and thermodynamic characterization of hydroxypentacyclitriterpenoic acid/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 2012; 73: 341–347.

FRANCO DE LIMA RA, DE JESUS MB, SAIA CEREDA CM, TOFOLI GR, CABEC LF, MAZZARO I, et al. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. *Journal of Drug Targeting.* 2012; 20: 85–96.

GAMAL A. Y. L, RADY M. KUMPER, GENDY ABD EL R R. AL. Doxycycline-Loaded b-Tricalcium Phosphate Release Following EDTA Root Surface Etching Improved the Clinical Outcomes in Chronic Periodontitis: An In Vivo Study. *J Periodontol* 2013;84:924-933.

GARG T, GOYAL AK. Medicated chewing gum: patient compliance oral drug delivery system. *Drug Deliv Lett.* 2014; 4: 72–8.

GARG, T., SINGH, O., ARORA, S., MURTHY, R. (2011). Dendrimer – a novel scaffold for drug delivery. *Int J Pharma Sci Rev Res*, 7: 211–20.

GARRETT S, ADAMS DF, BOGLE G, DONLY K. The effect of locally delivered controlled-release doxycycline or scaling and root planning on periodontal maintenance patients over 9 months. **J Periodontol.** 2000 Jan;71(1);22-30.

GARRETT S, JOHNSON L, DRISKO CH, ADAMS DF, BANDT C, BEISWANGER B, et al. Two multi-center studies evaluating locally delivered doxycycline hyclate, placebo control, oral hygiene, and scaling and root planing in the treatment of periodontitis. **J Periodontol.** 1999 May;70(5):490-503.

GENCO, C.A.; SIMPSON, W.; FORNG, R.Y.; EGAL, M.; ODUSANYA, B.M. Characterization of a Tn4351-generate hemin uptake mutant of *Porphyromonas gingivalis*: evidence for the coordinate regulation of virulence factors by hemin. **Infect. Immun.**,v. 63, p. 2459-2466, 1995.

GIANELLI M, CHELLINI F, MARGHERI M, TONELLI P, TANI A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. **Toxicol In vitro.** 2008; 22: 308-17.

GOLUB L. M., Hsi Ming Lee, Julie A. Stoner,† Timo Sorsa,‡ Richard A. Reinhardt,§ Mark S. Wolff,\*i Maria E. Ryan,\* Pirkka V. Nummikoski,; Jeffrey B. Payne. Subantimicrobial-Dose Doxycycline Modulates Gingival Crevicular Fluid Biomarkers of Periodontitis in Postmenopausal Osteopenic Women. **J Periodontol** 2008;79:1409-1418.

GOLUB, L. M., EVANS, R. T., MCNAMARA, T. F., LEE, H. M., RAMAMURTHY, N. S. (1994). A Non-Antimicrobial Tetracycline Inhibits Gingival Matrix Metalloproteinases and Bone Loss in *Porphyromonas gingivalis*-induced Periodontitis in Rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 732(1), 96-111.

GOMEZ RS, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2011 Oct 18. [Epub ahead of print].

GOMES LMM, PETITO N, COSTA VG, FALCÃO DQ, ARAÚJO KGL. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. **Food Chemistry.** 2014;148: 428–436.

GOODSON JM, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. **J Clin Periodontol** 1979;6:83–92.

GOODSON JM, HOLBOROW D, DUNN RL, HOGAN P, DUNHAM S. Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. **J Periodontol.**1983;54(10):575-79.

GOODSON JM. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of buccal therapy. *J Dent Res*. 1989; 68: 1625–1632.

GORDON MJ, WALKER BC. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol*. 1993;64:760-71.

GOYAL G, GARG T, MALIK B, ET AL. Development and characterization of niosomal gel for topical delivery of benzoyl peroxide. *Drug Deliv*. [Epub ahead of print]. 2013.

GRIFFEN AL, BEALL CJ, FIRESTONE ND, GROSS EL, DI FRANCO JM, HARDMAN JH et al. CORE: a phylogenetically curated. 2012. 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS ONE* 6: e19051.

GROSS EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA et al. (2010). Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol* 48: 4121–4128.

GUIGLIA R, DI-FEDE O, LO-RUSSO L, et al. Osteoporosis, jawbones and periodontal disease. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*. 2013; 18: 93–99.

GUPTA R, PANDIT N, AGGARWAL S, VERMA A. Comparative evaluation of subgingivally delivered 10% doxycycline hyclate and xanthan-based chlorhexidine gels in the treatment of chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(7): 25-32.

HAFFAJEE AD, CUGINI MA, DIBART S, SMITH C, KENT RL JR, SOCRANSKY SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:324-34.

HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS, GUNSOLLEY JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):115-81. Review. [Medline: [14971252](#)] [doi: [10.1902/annals.2003.8.1.115](#)]

HANES PJ, PURVIS JP. Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8:79-98.

HEINZ H. RENGGLI, WALTER FIEHN e PETER EICKHOLZ. Pharmacokinetic Profile of a Locally Administered Doxycycline Gel in Crevicular Fluid, Blood, and Saliva *Periodontol* 2002;73:1285-1291.

HERRERA D, MATESANZ P, BASCONES-MARTINEZ A, SANZ M. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J Evid Based Dent Pract*. 2012; 12: 50–60.

HOLMES, S. G., STILL, K., BUTTLE, D. J., BISHOP, N. J., GRABOWSKI, P. S. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. *Bone*. 2004; 35(2): 471-478.

HYUN S, S.G. KIM, H.Y. KWEON, Y.Y. JO, K.G. LEE, T.Y. KANG, W.S. CHAE, S.K. MIN, J. H. AHN, J.W. PARK, D.J. CHOI. Comparison of different concentrations of tetracycline-loaded silk fibroin membranes on the guided bone regeneration in the rat calvarial defect model, *Tissue Eng. Regen. Med*. 11 (2014) 476–482.

IMAMURA, T.; POTEPA, J.; PIKE, R.N.; MOORE, J.N.; BARTON, M.H.; TRAVIS, J. Effect of free vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: implications for bleeding tendency at periodontal sites. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4877-4882, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PESQUISA E ESTATÍSTICA – [cited 2016 April 26]. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=310620&idta=130&search=minas-gerais|belo-horizonte|estimativa-da-populacao-2015->. Portuguese.

IOANNOU I, DIMITRIADIS N, PAPADIMITRIOU K, VOUIROS I, SAKELLARI D, KONSTANTINIDIS A The Effect of Locally Delivered Doxycycline in the Treatment of Chronic Periodontitis. A Clinical and Microbiological Cohort Study. *J Oral Maxillofac Res*. 2010; 1(4): 1.

ISMAIL G, DUMITRIU HT, DUMITRIU AS, ISMAIL FB. Periodontal disease: a covert source of inflammation in chronic kidney disease patients. *Int J Nephrol*. 2013:1–6.

JACOB S. Global prevalence of periodontitis: a literature review. *Int Arab J Dentistry*. 2012; 3: 26–30.

JAIN N, JAIN GK, JAVED S, IQBAL Z, TALEGAONKAR S, AHMAD FJ, ROOP K, KHAR RK. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discovery Today*. 2008;13:21-22.

JEFFCOAT MK. Principles and pitfalls of clinical trials design. *J Periodontol* 1992; 63:1045-1051.

JENNING V, SCHAFFER-KORTING M, GOHLA S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*. 2000;66:115-126.

JEPSEN, K. E JEPSEN, S. Antibiotics/antimicrobials: Systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontology* 2000. 2016; 71: 82–112. DOI: 10.1111/prd.1212.

JERVOE-STORM, P. M., FUNKE, G., NOLDEN, R. Is subgingival antimicrobial support to mechanical root planing necessary? *J Dent Res*. 1996; **75**: 425.

JOLKOVSKY DL, WAKI MY, NEWMAN MG, OTOMO-CORGEL J, MADISON M, FLEMMIG TF, NACHNANI S, NOWZARI H. Clinical and microbiological effects of subgingival and gingival marginal irrigation with chlorhexidine gluconate. *J Periodontol* 1990;61:663-669.

JOLLEY L, MAJUMDAR S, KAPILA S. Technical factors in fractal analysis of periapical radiographs. *Dentomaxillofac Radiol*. 2006; 35: 393-397.

JONES DS, WOOLFSON AD, BROWN AF, COULTER WA, MCCLELLAND C, IRWIN CR. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *J Control Release*. 2000 Jul 3;67(2-3):357-68.

JORGENSEN MG, SAFARIAN A, DANESHMAND N, KEIM RJ, SLOTS J. Initial antimicrobial effect of controlled-release doxycycline in subgingival sites. *J*

JOSHI D, GARG T, GOYAL & GOUTAM RATH AK. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv*. 2016; 23(2): 363–377.

KATARIA K, SHARMA A, GARG T, et al. Novel technology to improve drug loading in polymeric nanofibers. *Drug Deliv Lett.* 2014; 4: 79–86.

KATO T., T. Tsuda, H. Inaba, S. Kawai, N. Okahashi, Y. Shibata, Y. Abiko, A. Amano, *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause G(1) arrest in osteoblastic/stromal cells. *Oral Microbiol. Immunol.* 23 (2008) 158e164.

KATZ, J.; YANG, Q.-B.; ZHANG, P.; POTEMPA, J.; TRAVIS, J.; MICHALEK, S.M.; BALKOVETZ, D.F. Hydrolysis of epithelial junction by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 2512-2518, 2002.

KAUR M, GARG T, RATH G, GOYAL AK. Current nanotechnological strategies for effective delivery of bioactive drug molecules in the treatment of tuberculosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2014; 31: 49–88.

KEMELBEKOV US, HAGENBACH A, LENTZ D, IMACHOVA SHO, PICHKHADZE GM, RUSTEMBEKOV ZHI, et al. Pharmacology and structures of the free base of the anaesthetic kazcaine and its complex with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Including Phenomena Macrocyclic Chemistry.* 2010; 68: 323–330.

KHANDAN A, OZADA N, KARAMIAN E. Novel microstructure mechanical activated nanocomposites for tissue engineering applications. *J. Bioeng. Biomed. Sci.* 2015;5:143.

KILLOY WJ, POLSON AM. Controlled local delivery of antimicrobials in the treatment of periodontitis. *Dent Clin North Am.* 1998 Apr; 42(2);263-83.

KILLOY WJ. Assessing the effectiveness of locally delivered chlorhexidine in the treatment of periodontitis. *J Am Dent Assoc.* 1999; 130: 567-70.

KIM TS, KLIMPEL H, FIEHN W, EICKHOLZ P: Comparison of the pharmacokinetic profiles of two locally administered doxycycline gels in crevicular fluid and saliva. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 286–292. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00494.x Blackwell Munksgaard, 2004.

KIM TS, THOMAS BÜRKLIN, BEATE SCHACHER, PETRA RATKA-KRÜGER, MATTHIJS T. SCHAECKEN. Pharmacokinetic Profile of a Locally Administered Doxycycline Gel in Crevicular Fluid, Blood, and Saliva. *J Periodontol* 2002;73:1285-1291.

KINANE DF, PRESHAW PM, LOOS BG. Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host response: Understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(11): 44-48.

KINANE DF, RADVAR M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol.* 1999 Jan;70(1):1-7.

KOLENBRANDER, P.E.; PLAMER JR., R.J.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N.I.; DIAZ, P.I. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.* 2000, v. 42, p. 47-79, 2006.

KORNMAN KS. Commentary: Periodontitis severity and progression are modified by various host and environmental factors. *J Periodontol* 2014; 85:1642-1645.

KRAYER JOE W., MSA, RENATA S. LEITE, MSA,C, KEITH L. KIRKWOOD, Non-Surgical Chemotherapeutic Treatment Strategies for the Management of Periodontal Diseases. *Dent Clin N Am* 54 (2010) 13–33

KURAMITSU HK, HE X, LUX R, ANDERSON MH, SHI W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007; 71:653-70. PMID:18063722. PMCID:2168648. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00024-07>

KURAMITSU, H.K.; KANG, I.C.; QI, M. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implications for cardiovascular diseases. *J. Periodontol.*, v. 74, p. 85-89, 2003.

KWAK KA, JYOTI MA, SONG HY. In vitro and in vivo studies of three dimensional porous composites of biphasic calcium phosphate/poly  $\epsilon$ -caprolactone: Effect of bio-functionalization for bone tissue engineering *Applied Surface Science.* 2014; 301: 307–314.

KWAK KA, KIM YH, KIM M, LEE BT, SONG HY. Bio-functionalization of polycaprolactone infiltrated BCP scaffold with silicon and fibronectin enhances osteoblast activity in vitro *Applied Surface Science.* 2013; 279: 13– 22.

LALLA E, PAPAPANOU PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011; 7: 738–48.

LAMONT, R.J; EL-SABAENY, A.; PARK, Y.; COOK, G.S; COSTERTON, J.W.; DEMUTH, D.R. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. **Microbiology**, v. 148, p. 1627-1636, 2002.

LANGER R, PEPPAS NA. *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology*. AIChE J. New York: 2003; 49(12): 2990-3006.

LANGER RS, PEPPAS NA. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**. 1981 Oct;2(4):201-14.

LEE HM, et al. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J. Periodontol*. 2004;75:453–463.

LEON VHR, LIMA EKNS, PIMENTEL ACM, et al. *Porphyromonas gingivalis* e periodontite crônica – avanços recentes. *Revista Bahiana de Odontologia*. 2016; 7(2): 147-154.

LI WJ, ET AL. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three dimensional nanofibrous compósito. *Biomaterials*. 2005; 26(25): 5158-5166.

LI, J.; HELMERHORST, E.J.; LEONE, C.W.; TROXLER, R.F.; YASKELL, T.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY,S.S.; OPPENHEIM, F.G. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 1311-1318, 2004.

LIN, X.; WU, J.; XIE, H. *Porphyromonas gingivalis* minor fimbriae are required for cell-cell interactions. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6011-6015, 2006.

LINDHE J, HEIJL L, GOODSON JM, SOCRANSKY SS. Local tetracycline delivery using hollow fiber devices in periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1979;6:141–9.

LINDHE, J. Tratado de periodontia clínica e implantologia bucal. 5ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan;2010.

LIU B-G, LI W, ZHAO, J, LIU, Y, ZHU, X-A, LIANG G-Z. Physicochemical characterization of the supramolecular structure of luteolin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*. 2013; 141: 900–906.

LIU C, XIA Z, CZERNUSZKA JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Chemical Engineering Research and Design*. 2007; 85: 1051–1064.

LIU, J.; LIN, S.; LI, L.; LIU, E. *Int J Pharm* 2005, 298, 117.

LOESCHE WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res*. 1979

MACHION L, ANDIA DC, SAITO D, KLEIN MI, GONÇALVES RB, CASATI MZ, NOCITI FH JR, SALLUM EA. Microbiological changes with the use of locally delivered doxycycline in the periodontal treatment of smokers. *J Periodontol*. 2004 Dec;75(12):1600-4. [Medline: [15732860](#)] [doi: [10.1902/jop.2004.75.12.1600](#)]

MACNEILL S, RINDLER E, WALKER A, BROWN AR, COBB CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study, *J Clin Periodontol*. 1997;24:753-60.

MARQUES HMC. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. 2010; 25(5): 313–326.

MARSH, P.D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J. Clin. Periodontol.*, v. 32, p. 7-15, 2005.

MCCOLL E, PATEL K, DAHLEN G, TONETTI M, GRAZIANI F, SUVAN J, LAURELL L. Supportive periodontal therapy using mechanical instrumentation or 2% minocycline gel: a 12 month randomized, controlled, single masked pilot study. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 141–150. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00879.x.

MENDES, A.B., FITTIPALDI, J.A., NEVES, R.C., CHACRA, A. R., MOREIRA, E. D. Jr. (2010). Prevalence and correlates of glycemic control: results from a nationwide survey in 6,671 adults with diabetes in Brasil. *Acta Diabetol*, 47(2), 137-145.

MIANI, et al. Avaliação de um gel contendo metronidazol para o tratamento adjuvante da periodontite crônica. [Doutoral Thesis]. Ribeirão Preto Universidade de São Paulo; 2010.

MISCH CE. Implantes dentais contemporâneos. 3rd ed. Elsevier, editor; 2009.

MOMBELLI A, SAMARANAYAKE LP. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *Int. Dent. J.* 2004; 54(1): 3-14.

MOMBELLI, A.; SCHMID, B; RUTAR, A.; LANG, N. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 14-21, 2000.

MOREJON MG, SALUP RD, CUE MB. Actualización en tetraciclinas. **Rev Cubana Farm.** 2003;37(3):1.

MORILLO JM, LAU L, SANZ M, HERRERA D, MARTIN C, SILVA A. Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2004;31:1054-60.

MOURA LA, RIBEIRO FV, AIELLO TB, et al. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 2015; 26(10): 573–584.

MUNDARGI RC, SRIRANGARAJAN S, AGNIHOTRI AS, PATIL SA, RAVINDRA S, SETTY SB, TEJRAJ M. AMINABHAVI TM. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ε-caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies. *Journal of Controlled Release.* 2007; 119: 59–68.

MURA P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2014; 101: 238–250

NAKAO, R.; SENPUKU, H.; WATANABE, H. *Porphyromonas gingivalis galE* is involved in lipopolysaccharide O-Antigen synthesis and biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6145-6153, 2006.

NEEDLEMAN IG. Controlled drug release in periodontics: A review of new therapies. *Br Dent J* 1991;170:405-8.

NEWMAN MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. **J Periodontal Res.** 1977 Mar;12(2):120-8.

NICKLES, K., SCHARF, S., ROLLKE, L., DANNEWITZ, B., EICKHOLZ, P. (2017). Comparison of Two Different Sampling Methods for Subgingival Plaque: Subgingival Paper Points or Mouthrinse Sample? *J Periodontol.* 88(4): 399-406.

NOACK, B.; GENCO, R.J.; TREVISAN, M.; GROSSI, S.; ZAMBON, J.J.; DE NARDIN, E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **J. Periodontol.**, v. 72,p. 1221-1227, 2001.

OBAIDAT AA, ALTAMIMI RM, HAMMAD MM. Formulation and Release of Doxycycline HCL from an Ion Activated In Situ Gelling Delivery System for the Treatment of Periodontal Disease. *Journal of Applied Polymer Science.* 2010; 115: 811–816.

OBEID PR, D'HOORE W, BERCY P. Comparative clinical responses related to the use of various periodontal instrumentation. *J Clin Periodontol.* 2004;31:193–9. [[PubMed](#)]

OKAHASHI N, H. INABA, I. NAKAGAWA, T. YAMAMURA, M. KUBONIWA, K. NAKAYAMA, S. HAMADA, A. AMANO, *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect. Immun.* 72 (2004) 1706e1714.

OOSTERWAAL PJM, MIKX FHM, RENGGLI HH. Clearance of a topically applied fluorescein gel from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990;17:613-615.

OSCARSSON J, Karched M, Thay B, Chen C, Asikainen S. Proinflammatory effect in whole blood by free soluble bacterial components released from planktonic and biofilm cells. *BMC Microbiol* 2008;8:206.

PAPPALARDO S, BAGLIO OA, CAPPELLO C, GUARRERA S, DE BENEDITTIS M, PETRUZZI M,

PARK JB. Effects of doxycycline, minocycline and tetracycline on cell proliferation, differentiation and protein expression in osteoprecursor cells. *J. Craniofac. Surg.* 2011;22:1839–1842.

PASCALE, D., GORDON, J., LAMSTER, I., MANN, P., SEIGER, M. & ARNDT, W. (1986) Concentration of doxycycline in human gingival fluid. *Journal of Clinical Periodontology* 13, 841–844.

PATARO AL, FRANCO CF, SANTOS VR, CORTÉS ME, SINISTERRA RD. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. *Biomaterials.* 2003; 24: 1075-80.

PATTNAIK S, et al. Periodontal muco-adhesive formulations for the treatment of infectious periodontal diseases. *Curr. Drug Deliv.* 2007;4:303–323.

PEREIRA MM, AL-SAFFAR N, SELVAKUMARAN, JLL. Cytotoxicity evaluation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams prepared by the sol-gel method. *Key Engineering Materials.* 2005; 284: 589-592.

**Periodontal Res.** 2004 Oct;39(5):315-9.

PETERSON JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev.* 2004; 9: 63-79.

PETURSSON S, HODGES SJ, HARRINGTON D, HOPPER C, HENDERSON B, HARRIS M. Fhyloquinonc ,vitamin Ki content of young adult jaw bone. *Journal of Dental Research* 1994; 73: 847.

PINHEIRO ALB, LIMEIRA JUNIOR FA, GERBI MEM. Effect of 830 nm laser light on the repairs of boné defects grafted with inorganic bovine bone and calcified cortical osseous membrane. *J. Clin. Laser Med.* 2003; 21: 383-388.

POLSON AM, GARRETT S, STOLLER NH, BANDT CL, HANES PJ, KILLOY WJ, et al. Multicenter comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis. II. Clinical results. **J Periodontol.** 1997 Feb;68(2):119-26.

POLSON AP, ET AL. Periodontal pocket treatment in Beagle Dogs using subgingival Doxycycline from a biodegradable system. I. Initial Clinical responses. *J Periodontol* 1996;67:1176-84.

PRESHAW PM, HEFTI AF, NOVAK MJ, et al. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J. Clin. Periodontol.* 2004;31:697–707.

PRIYANKA, N., KALRA, N., SAQUIB, S., KUDYAR, N., MALGAONKAR, N., JAIN, H., et al. (2015). Clinical and microbiological efficacy of 3% satranidazole gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: A randomized, controlled clinical trial. *Contemp Clin Dent*, 6, 364-70.

PUSHALKAR S, MANE SP, JI X, LI Y, EVANS C, CRASTA OR ET AL. (2011). Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 61: 269–277.

QIU N, CHENG X, WANG G-C, WANG W-W, WEN J-L, ZHANG Y-K, et al. Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Preparation and in vitro evaluation. *Carbohydrate Polymers.* 2014; 101: 623–630.

RAJEWSKI RA, STELLA VJ. Pharmaceutical Application of cyclodextrins. In vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1996; 85:1142-69.

RAMAMURTHY NS, LIU Y, TURNER G, RIFKIN BR, GOULB LM. Therapeutic inhibition of experimental periodontal breakdown in rates: comparison of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). **J Dent Res.** 2000;79:403.

RAMAMURTHY NS, RIFKIN BR, GREENWALD RA, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: A comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol* 2002;73:726-734.

RAMICH T, SCHACHER B, SCHARF S, et al. Subgingival plaque sampling after combined mechanical and antibiotic nonsurgical periodontal therapy. *Clin Oral Investig* 2015;19:27-34.

RAMS TE, SLOTS J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontol** 2000. 1996 Feb;10;139-59.

RAO NS, PRADEEP AR, KUMARI M, NAIK SB. Locally Delivered 1% Metformin Gel in the Treatment of Smokers with Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial *J Periodontol*. 2013; 84: 1165-1171.doi: 10.1902/jop.2012.120298.

RASLAN S, ALENCAR CO, CORTELLI JR, CORTELLI SC, AQUINO DR. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in association with *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in periodontal patients. *Rev Odontol UNESP*. 2011; 40(6): 304-309.

REDDY MS, GEURS NC, GUNSOLLEY JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003; 8(1): 12-37.

REYNOLDS M.A., C.K. LAVIGNE, G.E. MINAH, J.B. SUZUKI. Clinical effects of simultaneous ultrasonic scaling and subgingival irrigation with chlorhexidine. RIBERA A. Tetracyclines. **Treballs de la SCB**. 2004;55:121-134.

RICCI EJ, MARCHETTI JM. Zinc (II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 310: 187-195.

RIFFLE, A. B. (1952) The cementum during curettage. *Journal of Periodontology* 23, 170–177.

ROBERTS MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol Rev** 1996;19:1-24.

RODRIGUES RMJ, GONÇALVES C, SOUTO R, FERES-FILHO EJ, UZEDA M, COLOMBO APV: Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 420–427. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00493.x

ROSAN, B.; LAMONT, R.K. Dental plaque formation. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1599-1607, 2006.

SALVI GE, MOMBELLI A, MAYFIELD L, RUTAR A, SUVAN J, GARRETT S, et al. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. A randomized clinical trial comparing three biodegradable sustained release polymers. **J Clin Periodontol.** 2002;29:540-50.

SANDHYA, Y. P., VENKATESH PRABHUJI, M. L., CHANDRA, R. V. (2011). Comparative Evaluation of the Efficacy of 10% Doxycycline Hyclate in the Periodontal Treatment of Smokers – A Clinical and Microbiological Study. *Oral Health Prev Dent*, 9, 59-65.

SANZ I, ALONSO B, CARASOL M, et al. Nonsurgical treatment of periodontitis. *J Evid Based Dent Pract.* 2012; 12: 76–86.

SAPORSKI, P. Efeitos da associação entre ácido hialurônico e doxiciclina em doses subantimicrobianas sobre o reparo ósseo alveolar em ratos diabéticos. [monograph]. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. UNICAMP; 2010.

SCANNAPIECO FA, DASANAYAKE AP, CHHUN N. Does periodontal therapy reduce the risk for systemic diseases? *Dent Clin North Am.* 2010; 54: 163–181.

SCHACH VON WITTENAU M, BEEREBOOM JJ, BLACKWOOD RK, STEPHENS CR. 6- deoxytetracyclines. III. Stereochemistry at C6. **J Ame Chem Soc.** 1962;84:2645-47.

SE HEANG OH, BO RA NAM, IN SOO LEE, JIN HO LEE. Prolonged anti-bacterial activity of ion-complexed doxycycline for the treatment of osteomyelitis European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 98 (2016) 67–75.

SENER E, CINARCIK S, BAKSI BG. Use of Fractal Analysis for the Discrimination of Trabecular Changes Between Individuals With Healthy Gingiva or Moderate Periodontitis. J Periodontol. 2015; 86: 1364-1369. doi: 10.1902/jop.2015.150004.

SERAFINI MR, MENEZES PP, COSTA LP, LIMA CM, QUINTANS-JÚNIOR LJ, CARDOSO, JC, MATOS JR, SOARES-SOBRINHO JL, GRANGEIRO JR. S, NUNES PS, BONJARDIM LR, ARAÚJO AAS. Interaction of p-cymene with  $\beta$ -cyclodextrin. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2012; 109: 951–955.

SEYMOUR R.A, P.A. HEASMAN. Tetracyclines in the management of periodontal diseases, J. Clin. Periodontol. 22 (1995) 22–35.

SHANG, L.; ZHANG, S.; DU, H.; VENKATRAMAN, S. S. Eur J Pharm Biopharm 2008, 68, 715.

SHAPIRA, L.; AYALON, S.; BRENNER, T. Effects of *Porphyromonas gingivalis* on the central nervous system: activation of glial cells and exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 511-516, 2002.

SILNESS J, LÖE H. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand, 1964; 22: 121-135.

SINDEAUX R, FIGUEIREDO PT, DE MELO NS, et al. Fractal dimension and mandibular cortical width in normal and osteoporotic men and women. Maturitas. 2014; 77: 142- 148.

SINGH H, SHARMA R, JOSHI M, et al Transmucosal delivery of by mucoadhesive polymeric nanofibers. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2014. Under publication.

SLOTS J, RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY COMMITTEE. Systemic antibiotics in periodontics. J Periodontol 2004;75:1553-65.

SLOTS J, TING M. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: Occurrence and treatment. Periodontol 2000 1999;20:82-121.

SLOTS J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. **Scand J Dent Res.** 1976 Jan;84(1):1 -10.

SLOTS, J.; GIBBONS, R.J. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *Asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. **Infect. Immun.**, v. 19, p. 254-264, 1978.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT JR RL. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25: 134–144.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, SMITH C, DIBART S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 766–75. PMID:1661305. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.1991.tb00070.x>

SORSA T, TJADERHANE L, KONTTINEN YT, et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;38:306-321.

SOSKOLNE WA. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997; 8: 164–74.

SOSKOLONE WA, FREIDMAN MF. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: RATHBONE, M. J. (ed.). *Buccal mucosal drug delivery.* New York: 1996;74:359-379.

STEPHENS CR, MURAI K, RENNARD HH, GONOVER LH, BRUNINGS KJ. Hydrogenolysis studies in the tetracycline series: 6-deoxytetracyclines. **J Ame Chem Soc.** 1958;80:5324-25.

STOLLER NH, JOHNSON LR, TRAPNELL S, HARROLD CQ, GARRETT S. The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled-release delivery system containing doxycycline compared to systemically delivered doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva, and serum. **J Periodontol.** 1998 Oct;69(10):1085-91.

STOODLEY, P. SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUÁREZ DF, BONILLA JC, TRAJANO VCC, GONTIJO SML, GUIMARÃES PPG, CORTÉS ME, et al. Structural and thermodynamical characterization of doxycycline: cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions, *Colloids Surf. B:Biointerfaces*. 2014;118:194–201.

SZENTE, L. & SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science and Technology*. 2004; 15(3–4): 137–142.

TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y.; HUANG, Y.; ISHIKAWA, I. *Treponem socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity periodontal tissue destruction. **J. Periodontol.**, v. 72, p. 1354-1363, 2001.

TARIQ M, IQBAL Z, ALI J, et al. Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. *Int J Pharm Inv*. 2012; 2: 106–22.

THAMBUSAMY S, KRISHNAN S, KRISHNAMOORTHY S, RADHAKRISHNANCA S. Preparation and characterizations of solid/aqueous phases inclusion complex of 2,4-dinitroaniline with  $\beta$  cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*. 2014; 107: 72–84.

THEILADE E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. **J Clin Periodontol**. 1986 Nov;13(10);905-11.

THOMAS J, KARAKIOZIS J, POWALA C, DAWSON-AHDOH D, VAN KYKE L. Establishing the non-antimicrobial activity of chemically modified tetracyclines (CMTs) versus doxycycline. **J Dent Res**. 2000;79:403.

TOMASI C, WENNSTROM JL. Locally delivered Doxycycline improves the healing following non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Clin Periodontol* 2004; 31:589-595.

TONETTI MS, CORTELLINI P, CARNEVALE G, CATTABRIGA M, DE SANCTIS M, PINI PRATO GP. A controlled multicenter study of adjunctive use of tetracycline periodontal fibers in mandibular class II furcations with persistent bleeding. **J Clin Periodontol**. 1998 Sep;25(9):728-36.

TRAJANO VCC, COSTA KJR, LANZA CRM, SINISTERRA RD, CORTÉS ME. Osteogenic activity of cyclodextrin-encapsulated doxycycline in a calcium phosphate PCL and PLGA composite. *Materials Science and Engineering C*. 2016;64:370–375.

TUTER G, KURTIS B, SERDAR M, et al. Effects of scaling and root planing and sub-antimicrobial dose doxycycline on oral and systemic biomarkers of disease in patients with both chronic periodontitis and coronary artery disease. *J Clin Periodontol* 2007;34:673-681.

TUTER G., SERDA M.R, KURTISX B., et al. Effects of Scaling and Root Planing and Subantimicrobial Dose Doxycycline on Gingival Crevicular Fluid Levels of Matrix Metalloproteinase-8, -13 and Serum Levels of HsCRP in Patients With Chronic Periodontitis *J Periodontol* 2010; 81:1132-1139.

UEKAMA K, HIRAYAMA F, IRIE T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem Rev.* 1998; 98(5): 2045-76.

USKOKOVIC, V. (2015). Nanostructured platforms for the sustained and local delivery of antibiotics in the treatment of osteomyelitis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*, 32(1), 1–59.

VENNILA, K, ELANCHEZHIAN S., SUGUMARI ILAVARASU. Efficacy of 10% whole *Azadirachta indica* (neem) chip as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. **Indian Journal of Dental Research**. 27.1 (January-February 2016): p15.

VILLIERS, A.C.R. HEBD. SEANCES. *Acad. Sci.* 1891; 112: 536-8.

VINHOLIS Adriana Helena Chicharo; Luciene Cristina de FIGUEIREDO<sup>1</sup>; Elcio MARCANTONIO JUNIOR<sup>2</sup>; Rosemary Adriana Chiérici MARCANTONIO<sup>2</sup>; Sérgio Luiz Souza SALVADOR<sup>3</sup>; Gilberto GOISSIS<sup>4</sup> Subgingival Utilization of a 1% Chlorhexidine Collagen Gel for the Treatment of Periodontal Pockets. A Clinical and Microbiological Study *Braz Dent J* (2001) 12(3): 209-213

WADE WG. (2011). Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 38Suppl 11: 7–16.

WADE WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69: 137-143.

WAHL DA, SACHLOS E, LIU CZ, CZERNUSZKA J. *Mater. Sci. Mater. Med.* 2007; 18: 201.

WALKER CB, KARPINIA K, BAEHNI P. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. **Periodontol** 2000. 2004;36:146-65.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WENNSTRÖM JL, NEWMAN HN, MACNEILL SR, KILLOY WJ, GRIFFITHS GS, GILLAM DG,

WHITE SC, RUDOLPH DJ. Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88: 628-635.

WOLF HF, EDITH M, H. RATEITSCHAK KLAUS H. Periodontia tema do cap. In: Autores do livro. Coleção Artmed de Atlas Coloridos de Odontologia 2006. 3a EDIÇÃO– Porto Alegre: Artmed. p.4 -18.

Yang R, Chen JB, Xiao CF. et al. Inclusion complex of GA-13316 with beta-cyclodextrin: preparation, characterization, molecular modeling, and in vitro evaluation. *Carbohydrate Polymers.* 2014; 111: 655–662.

YILMAZ, O. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. **Microbiology**, v. 154, p. 2897-2903, 2008.

ZAFAR N, FESSI H, ELAISSARI A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: from preparation to drug delivery applications. *Int. J. Pharm.* 2014; 461: 351–366.

ZHANG Y, REN K, HE Z-Y, LI H-L, CHEN T, LEI Y, et al. Development of inclusion complex of brinzolamide with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Carbo-hydrate Polymers.* 2013; 98: 638–643.

ZHANG, W. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* invades osteoblasts and inhibits bone formation, *Microb Infect* (2010), doi:10.1016/j.micinf.2010.05.011

ZILBERMAN M, ELSNER JJ. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J Control Release.* 2008; 130:202–15.

## ANEXOS

### ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução nº 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde).

Estamos convidando a Você para participar da pesquisa **“EFEITO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DOXICICLINA PARA O CONTROLE DA PERIODONTITE – ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO MASCARAMENTO”**. Pretendemos avaliar a efetividade de um antimicrobiano em gel, a doxiciclina, de uso frequente na clínica odontológica e altamente eficaz. Os dados serão coletados a partir de avaliações clínicas e laboratoriais. Quanto aos procedimentos que serão realizados e acompanhados por um único pesquisador: exame clínico, coleta de dados, sondagem inicial, coleta de amostras do fluido gengival, aplicação do gel, assim como as sondagens posteriores e radiografia inicial e final. Apesar de o material ser biocompatível e você ter sido selecionado (a) por relatar que não apresenta reação alérgica a nenhum dos componentes presentes na formulação dos géis, pode ocorrer processo inflamatório seja decorrente dos exames físicos, seja por reação alérgica ao gel, que será devidamente tratado, quando for o caso. Entretanto, como benefício, você pode apresentar melhoras dos parâmetros clínicos da periodontite.

Sua participação reflete seu interesse em colaborar para o desenvolvimento do projeto, tendo sido colocada, quando inicialmente contatado (a), a garantia da possibilidade de aceitar ou não a participar desse projeto de pesquisa, tendo a liberdade de retirar meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo a continuação do seu tratamento na FOUFG. Os resultados desse trabalho serão tornados públicos à comunidade científica, haverá tratamento adequado dos dados e materiais biológicos, preservando-se a identidade de todos os participantes. **Você não será remunerado assim como não haverá despesas adicionais.**

Fui devidamente esclarecido dos potenciais riscos e benefícios do tratamento proposto, que os dados serão manipulados exclusivamente pela equipe de pesquisadores, **recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e tive garantia dos meus direitos fundamentais como sujeito da pesquisa (informação, privacidade, recusa inócuca, desistência, tratamento, continuidade do atendimento, acesso ao pesquisador e ao Comitê de Ética em pesquisa da UFMG). **O Comitê de Ética deverá ser contatado somente em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos da pesquisa.**

Declaro ter lido e entendido os termos da pesquisa:

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2014.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do indivíduo ou responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

VIVIANNE CARVALHO DA CUNHA TRAJANO

\_\_\_\_\_  
Assinatura da orientadora

MARIA ESPERANZA CORTÉS

Qualquer sugestão, informação adicional, dúvidas ou reclamações entre em contato: **Pesquisador responsável:** Vivianne Carvalho da Cunha Trajano, tel: (31) 9154-5259/ (31) 3403-2137 ou ao Comitê de Ética em pesquisa da UFMG, Av. Antônio Carlos 6627 – Unidade Administrativa II 3409-4592.

## ANEXO 2 – FICHA CLÍNICO-ODONTOLÓGICA DE COLETA DOS DADOS.

Pesquisa: **EFEITO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DOXICICLINA PARA O CONTROLE DE PLACA E GENGIVITE – ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO MASCARAMENTO**

### **FICHA CLÍNICA**

Nº \_\_\_\_\_

História médica:

#### **1. Identificação:**

Indivíduo: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Nacionalidade: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Filiação: \_\_\_\_\_

End.Resid.: \_\_\_\_\_

End.Profissional: \_\_\_\_\_

Tel. Resid.: \_\_\_\_\_ Tel. Comerc.: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

#### **2. Avaliação de sistemas**

Cardiovascular: (Cardiopatias – Hipertensão – Hipotensão – Sangramentos – Anemias).

Gastrointestinal: (Úlceras – Gastrite – Vômitos – Enjôos – Hemoptise).

Geniturinário: (Cistites – Infecções renais – Sífilis – Gonorréia – Candidíase – Herpes).

Respiratório: (Gripes – Bronquite – Pneumonia – Asma – Sinusite – Tuberculose).

Neurológico: (Desmaios – Tonturas – Disritmia – Epilepsia).

Doenças reumáticas: (Artrite reumatóide – Febre reumática).

Endócrino: (Diabete – Hipoglicemia – Hepatite).

Outros: \_\_\_\_\_

3. Uso de medicamentos:  NÃO  SIM \_\_\_\_\_

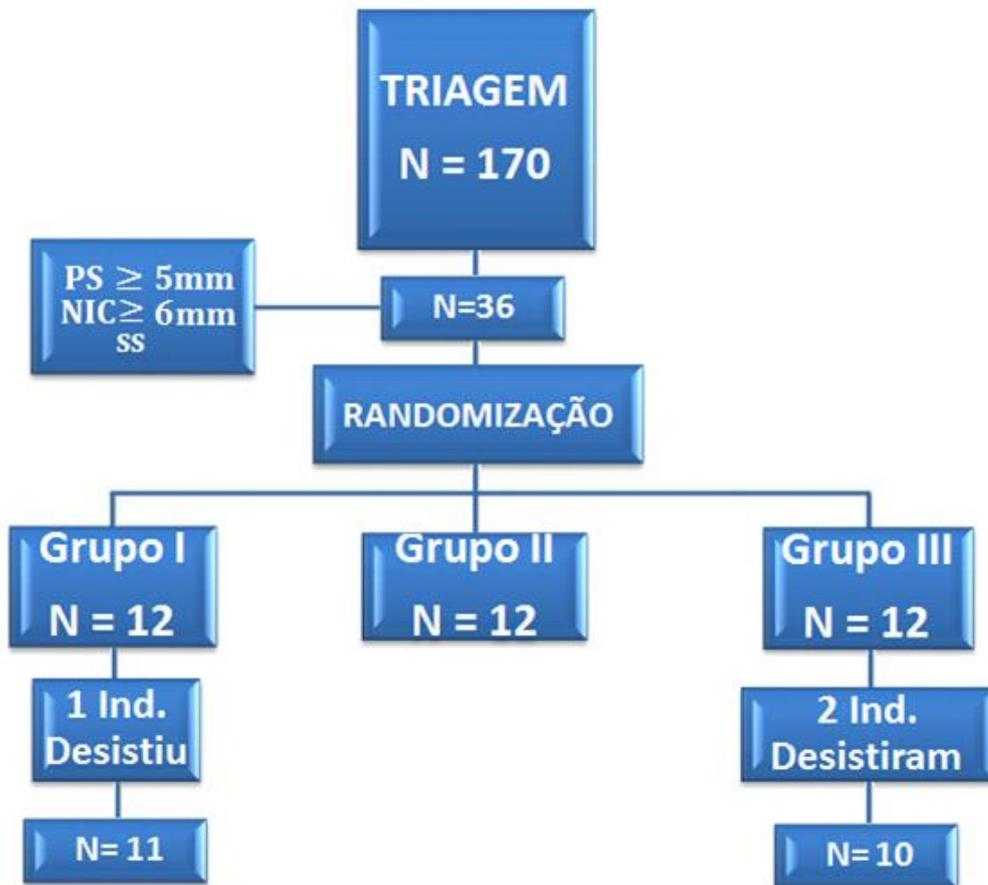
4. Tratamento periodontal anterior:  NÃO  SIM \_\_\_\_\_

5. Fumante:  NÃO  SIM \_\_\_\_\_

6. Grávida/Lactente:  NÃO  SIM \_\_\_\_\_

7. Alergia:  NÃO  SIM \_\_\_\_\_

## ANEXO 3 - FLUXOGRAMA EXPLICATIVO DO DESENHO DO ESTUDO



**ANEXO 4 – ARTIGOS PUBLICADOS**

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 32011214.6.0000.5149

Interessado(a): Prof<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortes Segura  
Departamento de Odontologia Restauradora  
Faculdade de Odontologia- UFMG

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Efeito de um sistema de liberação controlada de doxiciclina para o controle da doença periodontal: ensaio clínico randomizado duplo mascaramento"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Prof. Dr<sup>a</sup>. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG



### APÊNDICE 3 – AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PLACA FO-UFMG

#### FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFMG

#### Índice de Placa de Silness & Loe:

Nome: \_\_\_\_\_ Reg. FOUFGM Nº: \_\_\_\_\_

#### PESOS PARA EXAME:

0 - Ausência de placa.

0,5 - Presença de placa em pontos esparsos, fora da junção dento-gengival.

1 - Presença de placa supra gengival, estendendo-se até 1/3 da superfície exposta do dente.

2 - Presença de placa supra gengival, cobrindo mais de 1/3 e menos de 2/3 da superfície exposta.

3 - Presença de placa supra gengival, cobrindo mais de 2/3 da superfície exposta do dente.

#### SIGNIFICADOS:

1- ÓTIMO = 0 a 16 %

2- BOM = 16 a 33%

3- MAU = 33 a 66%

4- PÉSSIMO = 66 a 100%

Data:

Dentes 18,17,16,15,14	Dentes 13,12,11,21,22,23	Dentes 24,25,26,27,28	Subtotal	Total	Percentual/ Significado
Dentes 48,47,46,45,44	Dentes 43,42,41,31,32,33	Dentes 34,35,36,37,38			

Data:

Dentes 18,17,16,15,14	Dentes 13,12,11,21,22,23	Dentes 24,25,26,27,28	Subtotal	Total	Percentual/ Significado
Dentes 48,47,46,45,44	Dentes 43,42,41,31,32,33	Dentes 34,35,36,37,38			

Data:

Dentes 18,17,16,15,14	Dentes 13,12,11,21,22,23	Dentes 24,25,26,27,28	Subtotal	Total	Percentual/ Significado
Dentes 48,47,46,45,44	Dentes 43,42,41,31,32,33	Dentes 34,35,36,37,38			

Data:

Dentes 18,17,16,15,14	Dentes 13,12,11,21,22,23	Dentes 24,25,26,27,28	Subtotal	Total	Percentual/ Significado
Dentes 48,47,46,45,44	Dentes 43,42,41,31,32,33	Dentes 34,35,36,37,38			



continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**  
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

em anexo

10. **Procurador (74):**

10.1 Nome

CPF/CGC:

10.2 Endereço:

10.3 CEP: 10.4 Telefone

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):  
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	15 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	02 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar): <b>ESTATUTO E DESIGNAÇÃO, CNPJ e Declaração</b>				10 fls.
	11.10 Total de folhas anexadas:				28 fls;

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

BH, 03/11/2004  
Local e Data

Assinatura e Carimbo

Prof. Marcos Borato Viana  
Vice-Reitor

FORMULÁRIO

3.

**ANEXO 1 – CONTINUAÇÃO DO FORMULÁRIO 2.**

**TÍTULO DA INVENÇÃO, DO MODELO DE UTILIDADE OU DO CERTIFICADO DE ADIÇÃO (54):**

---

"PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE GÉIS MUCOADESIVOS PARA PREVENÇÃO DE CÁRIE, USOS E PRODUTOS DERIVADOS".

---

7.

7.6 Nome : Maria Auxiliadora Pedroso

7.7 Qualificação: Professora

7.8 Endereço: Rua Jaguaribe, 925/904 – Renascença - Belo Horizonte - MG

7.9 Telefone: 31-3442-1298

7.10 Nome: Ruben Dário Sinisterra Millán

7.11 Qualificação: Professor

7.12 Endereço: Rua João Antonio Cardoso, 64/301 – Bairro Ouro Preto - Belo Horizonte – MG

7.13 Telefone: 31-3499-5778

## APÊNDICE 5 TWO -WAY ANOVA GROUP I X GROUP II

Table Analyzed                      Data 1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	12,90	0,1571
Radiographic analysis	0,70	0,6434
T0, T1, T2	29,90	0,0219

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Radiographic analysis	ns	No
T0, T1, T2	*	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	2	0,01625	0,008126	2,055
Radiographic analysis	1	0,0008766	0,0008766	0,2216
T0, T1, T2	2	0,03766	0,01883	4,762
Residual	18	0,07119	0,003955	

Number of missing values                      6

Bonferroni posttests

GROUP I vs GROUP II

T0, T1, T2	GROUP II	GROUP I	Difference	95% CI of diff.
T0	0,9153	0,9758	0,06057	-0.06063 to 0.1818
T1	1,031	1,000	-0,03082	-0.1520 to 0.09039
T2	1,076	1,009	-0,06720	-0.1884 to 0.05400
T0, T1, T2	Difference	t	P value	Summary
T0	0,06057	1,319	P > 0.05	ns
T1	-0,03082	0,6711	P > 0.05	ns
T2	-0,06720	1,463	P > 0.05	ns

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A utilização de sistemas de liberação locais de fármacos tem demonstrado eficácia comprovada na literatura, em diferentes áreas e nos tratamentos de diversas patologias, seja como monoterapia, seja como adjuvantes aos tratamentos convencionais. Sistemas de liberação de antimicrobianos administrados localmente, empregando mais recentemente veículos de liberação sustentada contendo DOX adjuntos à RAR, têm apresentado bons resultados clínicos e biológicos.

A DOX foi o fármaco de escolha no presente estudo por apresentar características singulares que a torna uma das tetraciclinas mais empregadas em sistemas de liberação local de antimicrobianos, apresentando atividade sobre patógenos periodontais e comprovada efetividade na periodontite crônica. As propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (adsorção, biodisponibilidade, prolongada meia-vida, substantividade e baixas concentrações no plasma são suficientes para se atingir o MIC), o efeito anti-inflamatório, é o inibidor mais potente das MMPs, o efeito osteogênico, favorece formação de tecido ósseo pela ativação dos osteoblastos e inibição dos osteoclastos (Killooy, 1999).

O presente estudo mostrou que a aplicação do gel da DOX a 10%, incluída em  $\beta$ -CD, associada à RAR apresentou melhora significativa nos parâmetros clínicos periodontais (PSP, NIC e SS) e do IPV, em todos os protocolos analisados, proporcionando benefícios adicionais à RAR sozinha. O gel contendo somente DOX a 10% também apresentou benefícios significativos à RAR sozinha, porém menores se comparado ao gel com o composto de inclusão (DOX/  $\beta$ -CD). Pode-se sugerir que o composto de inclusão e a reaplicação dos géis promoveram diferenças nos resultados. Os indivíduos tratados passaram para bolsas periodontais mais rasas ao final da investigação. Do ponto de vista clínico, este resultado traduz-se em ganho real da saúde periodontal. Neste ensaio clínico não houve relatos dos pacientes sobre reações adversas, sabor desagradável ou qualquer desconforto durante o uso dos géis. Portanto, o gel com o composto de inclusão de doxiciclina em  $\beta$ -CD, liberada localmente, pode ser um adjuvante quimioterapêutico importante no tratamento da periodontite crônica.

Contudo, considerando os limites do presente estudo, pesquisas futuras serão necessárias para avaliar os efeitos do gel de DOX a 10% incluída em  $\beta$ -CD, no biofilme subgengival, na resposta inflamatória do indivíduo tratado e no reparo dos defeitos ósseos periodontais. Pelo fato da avaliação radiográfica não ser o método mais sensível para detectarmos diferenças no reparo ósseo entre os grupos deve-se realizar também a avaliação histológica para definir o real padrão de cicatrização resultante dos diferentes tratamentos testados. Assim como, quantificar as concentrações de DOX no fluido crevicular gengival e na saliva, a fim de determinar as menores doses efetivas que não desenvolvam resistência bacteriana. O maior desafio tem sido o desenvolvimento de ensaios que permitam a quantificação do fármaco em pequenos volumes de fluido gengival.

Como a intervenção foi implementada para ambos os sexos, de grande faixa etária, em diferentes níveis de PPS e NIC, e incluindo grupos tratados e não tratados, um amplo espectro da lesão foi coberto. Os resultados indicam que outras pessoas com PC poderiam se beneficiar do uso adjuvante do gel de DOX incluída em  $\beta$ -CD, reduzindo o impacto das sequelas de periodontite e melhorando a qualidade de vida.

Outro achado importante da presente pesquisa foi que, após a segunda aplicação, os melhores resultados reforçam a necessidade da presença do fármaco no sítio alvo por mais tempo. Entretanto, são necessários outros ensaios clínicos que avaliem os efeitos em longo prazo, investigando a necessidade de reaplicações periódicas. Assim como, a formulação de um protocolo de aplicações, que poderiam contribuir para maior aceitação da associação de antimicrobianos locais ao controle mecânico do biofilme em portadores de periodontite crônica.

## 7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

### 7.1 Artigos publicados

- 1- **Osteogenic activity of cyclodextrin-encapsulated doxycycline in a calcium phosphate PCL and PLGA composite.** V.C.C. Trajano, K.J.R. Costa, C.R.M. Lanza, R.D. Sinisterra, M.E. Cortés.

Revista: Materials Science and Engineering C (2016); 64: 370–375. Ref. No.: MSEC-D-15-02117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.103>

- 2- **Structural and thermodynamical characterization of doxycycline:  $\beta$ Cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions.** Diego F. Suárez, Jessika Consuegra, Vivianne C. Trajano, Sávio M.L. Gontijo, Pedro P.G. Guimarães, Maria E. Cortés, Ângelo L. Denadai, Rubén D. Sinisterra.

Revista: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (2014); 118: 194–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.040>

### 7.2 Artigo aceito

- 1 **Inflammatory myofibroblastic tumor in the retromolar region of mandible: a case report and literature review.** Fabrício Tinôco Alvim de Souza, PhD; Elisa Carvalho de Siqueira; Viviane Carvalho da Cunha Trajano, MsC; Júlio César Tanos de Lacerda, MsC; Maria Cássia Ferreira de Aguiar, PhD; Ricardo Alves de Mesquita, PhD. Revista: Journal of Oral Diagnosis.

### 7.3 Artigos submetidos

- 1- **Testosterone improves the osteogenic potential of composite for local application.** Kelen J Costa, DDS, MSc, PhD; Alfonso Gala-Garcia, DDS, MSc, PhD; Joel J Passos, PhD; Vivianne Cunha Trajano, DDS, MSc, PhD Candidate; Vagner R Santos, DDS, MSc, PhD; Ruben Dario Sinisterra, PhD; Célia M Lanza, DDS, MSc, PhD; Maria Esperanza Cortés, DDS, MSc, PhD. Revista: *Calcified Tissue International*. Ref. No.: CTIN-D-17-00127 - Submission Notification to co-author.

### 7.4 Resumos

- 1- **XII ENCONTRO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS E X ENCONTRO MINEIRO DAS FACULDADES DE ODONTOLOGIA**, realizado em BH, MG, nos dias 8, 9, 10 de maio de 2014. Membro da Comissão Organizadora.

**RESUMO: AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO DE DOXICICLINA:  $\beta$ -CICLODEXTRINA NA VIABILIDADE CELULAR E NA INTERAÇÃO COM MEMBRANA BACTERIANA.**

Vivianne C. TRAJANO<sup>\*a</sup>, Diego F. SUÁREZ<sup>b</sup>, Jessika CONSUEGRA<sup>c</sup>, Savio M.L. GONTIJO<sup>a</sup>, Pedro P.G. GUIMARÃES<sup>b</sup>, Ângelo L. DENADA<sup>d</sup>, Rubén D. SINISTERRA<sup>b</sup>, Célia Regina LANZA<sup>a</sup>, Maria E. Cortés SEGURA<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> *Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UFMG,*

<sup>b</sup> *Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais,*

<sup>c</sup> *Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas–ICB, UFMG,*

<sup>d</sup> *Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, MG.*

Objetivo: O uso da Doxíciclina (DOX) no controle da periodontite é comprovadamente benéfico. Recentemente complexos de inclusão da DOX em  $\beta$ CD (betaciclodextrina) foram propostos considerando sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a capacidade de promover crescimento de osteoblastos. Este estudo objetivou avaliar os parâmetros estruturais e termodinâmicos da DOX e do complexo de inclusão DOX/ $\beta$ CD, assim como avaliar suas viabilidades celulares e interações com as células de *Staphylococcus aureus*. Metodologia: Foram preparados compostos de inclusão DOX/ $\beta$ CD. Estes juntamente com a DOX livre, foram caracterizados fisicoquimicamente através da análise do estado sólido, da ressonância magnética nuclear (RMN), da calorimetria de titulação isotérmica (CTI), da análise do espalhamento dinâmico da luz, do potencial Zeta (PZ) e estudada a resposta antimicrobiana e citotóxica *in vitro*. Resultados: A interação da DOX e da DOX/ $\beta$ CD com *S. aureus* foi obtida não só pela redução exponencial do tamanho do *S. aureus* quando o fármaco livre e as concentrações dos complexos de inclusão foram acrescentados, mas também pela neutralização gradual da carga da membrana celular do *S. aureus*. A DOX/ $\beta$ CD foi mais ativa contra *S. aureus* do que a DOX pura. Foi observada baixa citotoxicidade e maior proliferação de células de osteoblastos na presença de DOX/ $\beta$ CD quando comparado com a DOX livre. Conclusões: Estes resultados promissores demonstraram que o mecanismo de ação da DOX foi alterado quando incluída no composto de inclusão tornando-a mais eficaz na inibição bacteriana em baixas concentrações e pode ser uma estratégia de formulação antimicrobiana para novas aplicações farmacológicas.

Apoio: CNPq e INCT/NANOBIOFAR.

**2- XXI JORNADA MINEIRA DE ESTOMATOLOGIA, no período de 20 a 22 de agosto de 2014, realizado na UninCor-Campus BH.**

**RESUMO: MANIFESTAÇÃO BUCAL E A IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO PÊNFIGO VULGAR PELO CIRURGIÃO-DENTISTA: RELATO DE CASO.**

Vivianne Carvalho da Cunha Trajano<sup>1</sup>, Adriano Amâncio Trajano<sup>2</sup>, Júlio César Tanos de Lacerda<sup>3</sup>

1-Estudante de doutorado em odontologia da UFMG, 2- Estudante de pós-graduação da UFMG<sup>2</sup>, 3- Cirurgião-Dentista Estomatologista Hospital Odilon Behrens<sup>3</sup>.

**Introdução:** O Pênfigo Vulgar é uma enfermidade autoimune, muco-cutânea, de caráter crônico, onde as lesões bolhosas da mucosa bucal podem anteceder as lesões cutâneas. Afeta mucosas e pele através de vesículas e bolhas de diâmetros variáveis, solitárias ou em grupos. Acomete mais frequentemente indivíduo entre 50 a 60 anos. Apesar de sua baixa ocorrência, é considerada uma patologia importante, já que pode ser fatal quando não diagnosticada e tratada na fase inicial. Assim, O diagnóstico precoce é de extrema importância. **Objetivo:** Demonstrar a importância do diagnóstico precoce pelo Cirurgião-Dentista de doenças sistêmicas que podem ter manifestações bucais primárias. **Metodologia:** Relato de caso da indivíduo S.V.V., 47 anos, sexo feminino, encaminhada para o Serviço de Estomatologia do Hospital Odilon Behrens (HOB) pelo centro de saúde. Indivíduo com queixa álgica intensa em toda a cavidade bucal, apresentando múltiplas lesões ulceradas em toda a boca e lábios. Foi realizado exame bucal e posterior biópsia incisional, para confirmação do diagnóstico clínico através de exame complementar, sobretudo o histopatológico. Foi prescrita solução anestésica spray para alívio da dor ao alimentar e corticoide via bucal (prednisona – 20 mg/dia, por 7 dias). **Resultados:** Após uma semana de tratamento, a indivíduo retornou ao HOB com alívio dos sintomas e discreta regressão das lesões bucais. Esta foi orientada a continuar o tratamento com corticoides local e sistêmico e informada sobre a doença, incluindo manifestações, tratamento e possíveis complicações. **Conclusões:** O Cirurgião-Dentista assume importante papel na identificação das lesões do Pênfigo Vulgar, uma vez que na grande maioria das vezes, as lesões bucais precedem as manifestações sistêmicas da doença. Realizando o diagnóstico precoce e prescrevendo tratamento imediato e adequado, previne-se a evolução sistêmica da doença e das morbidades a ela associadas.

**Palavras-chave:** Hospital Odilon Behrens, Pênfigo Vulgar, Diagnóstico Precoce.

**REFERÊNCIAS:**

1. AMORMINO, S.A.F. , BARBOSA,A.A.M.; Pênfigo vulgar:Revisão de literatura e relato de caso clínico. R. Periodontia,volume 20, número 02, junho 2010.

2. MIZIARA, I.D. ET AL; Acometimento bucal no pênfigo vulgar. Rev. Bras. Otorrinolaringol. V.69, n.03, 327-331, mai/jun.2003.

3. NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JE. Patologia Bucal & Maxilofacial. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 798 p.

4. CAWSON RA, BINNIE WH, EVESON JW. Atlas colorido de enfermidades da boca – correlações clínicas e patológicas. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1997.

**INSTITUIÇÃO:** HOSPITAL ODILON BEHRENS

**CATEGORIA:** PÓS-GRADUAÇÃO

**MODALIDADE:** PESQUISA

**FORMA DE APRESENTAÇÃO:** PAINEL CASO CLÍNICO

**3- I SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG - A MICROBIOLOGIA E A SOCIEDADE**, nos dia 01 e 02 de setembro de 2014.

**RESUMO: COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE DOXICICLINA/ $\beta$ -CICLODEXTRINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO NA VIABILIDADE CELULAR E COM A MEMBRANA DO *Staphylococcus aureus*.**

Trajano VCC<sup>\*a</sup>, Suares DF<sup>b</sup>, Consuegra J<sup>c</sup>, Gontijo SML<sup>a</sup>, Guimarães P<sup>b</sup>, Denadai AL<sup>d</sup>, Sinisterra RD<sup>b</sup>, Lanza CR<sup>a</sup>, Segura MEC<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> *Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UFMG,*

<sup>b</sup> *Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais,*

<sup>c</sup> *Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas–ICB, UFMG,*

<sup>d</sup> *Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, MG.*

Complexos de inclusão da DOX em  $\beta$ CD (betaciclodextrina) foram propostos considerando sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a capacidade de

promover crescimento de osteoblastos. Este estudo objetivou avaliar os parâmetros estruturais e termodinâmicos da DOX e do complexo de inclusão DOX/ $\beta$ CD, assim como avaliar suas viabilidades celulares e interações com as células de *Staphylococcus aureus*. Foram preparados compostos de inclusão DOX/ $\beta$ CD. Estes juntamente com a DOX livre, foram caracterizados fisicoquimicamente através da análise do estado sólido, da ressonância magnética nuclear (RMN), da calorimetria de titulação isotérmica (CTI), da análise do espalhamento dinâmico da luz, do potencial Zeta (PZ) e estudada a resposta antimicrobiana e citotóxica *in vitro*. A interação da DOX e da DOX/ $\beta$ CD com *S. aureus* foi obtida não só pela redução exponencial do tamanho do *S. aureus* quando o fármaco livre e as concentrações dos complexos de inclusão foram acrescentados, mas também pela neutralização gradual da carga da membrana celular do *S. aureus*. A DOX/ $\beta$ CD foi mais ativa contra *S. aureus* do que a DOX pura. Foi observada baixa citotoxicidade e maior proliferação de células de osteoblastos na presença de DOX/ $\beta$ CD quando comparado com a DOX livre. Estes resultados demonstraram que o mecanismo de ação da DOX foi alterado quando incluída no composto de inclusão tornando-a mais eficaz na inibição bacteriana em baixas concentrações e pode ser uma formulação antimicrobiana para novas aplicações farmacológicas.

Palavras-chave: doxiciclina, betaciclodextrina, complexo de inclusão.

Apoio: CNPq e INCT/NANOBIOPAR.

**4- 31<sup>a</sup> REUNIÃO DA ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, no período de 03 a 07 de setembro de 2014, em Águas de Lindóia-SP.**

**RESUMO: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE DOXICICLINA:  $\beta$ -CICLODEXTRINA NA VIABILIDADE CELULAR E COM MEMBRANA BACTERIANA.**

Trajano VCC<sup>\*a</sup>, Suares DF<sup>b</sup>, Consuegra J<sup>c</sup>, Gontijo SML<sup>a</sup>, Guimarães P<sup>b</sup>, Denadai AL<sup>d</sup>, Sinisterra RD<sup>b</sup>, Lanza CR<sup>a</sup>, Segura MEC<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UFMG,

<sup>b</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais,

<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas–ICB, UFMG,

<sup>d</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, MG.

Complexos de inclusão da DOX em  $\beta$ CD (betaciclodextrina) foram propostos considerando sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a capacidade de promover crescimento de osteoblastos. Este estudo objetivou avaliar os parâmetros estruturais e termodinâmicos da DOX e do complexo de inclusão DOX/ $\beta$ CD, assim como avaliar suas viabilidades celulares e interações com as células de *Staphylococcus aureus*. Foram preparados compostos de inclusão DOX/ $\beta$ CD. Estes juntamente com a DOX livre, foram caracterizados fisicoquimicamente através da análise do estado sólido, da ressonância magnética nuclear (RMN), da calorimetria de titulação isotérmica (CTI), da análise do espalhamento dinâmico da luz, do potencial Zeta (PZ) e estudada a resposta antimicrobiana e citotóxica *in vitro*. A interação da DOX e da DOX/ $\beta$ CD com *S. aureus* foi obtida não só pela redução exponencial do tamanho do *S. aureus* quando o fármaco livre e as concentrações dos complexos de inclusão foram acrescentados, mas também pela neutralização gradual da carga da membrana celular do *S. aureus*. A DOX/ $\beta$ CD foi mais ativa contra *S. aureus* do que a DOX pura. Foi observada baixa citotoxicidade e maior proliferação de células de osteoblastos na presença de DOX/ $\beta$ CD quando comparado com a DOX livre. Estes resultados demonstraram que o mecanismo de ação da DOX foi alterado quando incluída no composto de inclusão tornando-a mais eficaz na inibição bacteriana em baixas concentrações e pode ser uma formulação antimicrobiana para novas aplicações farmacológicas.

Palavras-chave: doxiciclina, betaciclodextrina, complexo de inclusão.

Apoio: CNPq e INCT/NANOBIOFAR.

**5- 12º CONGRESSO INTERNACIONAL DE ODONTOLOGIA DE MINAS GERAIS, de 08 a 11 de outubro de 2014, BH-MG.**

**RESUMO: AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO DE DOXICICLINA:  $\beta$ -CICLODEXTRINA NA VIABILIDADE CELULAR E NA INTERAÇÃO COM MEMBRANA BACTERIANA.**

Vivianne C. TRAJANO\*<sup>a</sup>, Diego F. SUÁREZ<sup>b</sup>, Ângelo L. DENADAI<sup>c</sup>, Rubén D. SINISTERRA<sup>b</sup>, Maria E. Cortés SEGURA<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UFMG,

<sup>b</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais,

<sup>c</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, MG.

**CATEGORIA: PROFISSIONAL PESQUISA**

Complexos de inclusão da DOX em  $\beta$ CD (betaciclodextrina) foram propostos considerando sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a capacidade de promover crescimento de osteoblastos. Este estudo objetivou avaliar os parâmetros estruturais e termodinâmicos da DOX livre e do complexo de inclusão DOX/ $\beta$ CD e avaliar suas viabilidades celulares e interações com as células de *Staphylococcus aureus*. Os compostos de inclusão DOX/ $\beta$ CD e a DOX foram caracterizados fisicoquimicamente através da análise do estado sólido, da ressonância magnética nuclear, da calorimetria de titulação isotérmica, da análise do espalhamento dinâmico da luz, do potencial Zeta e avaliada a resposta antimicrobiana e citotóxica *in vitro*. A interação da DOX e da DOX/ $\beta$ CD com *S. aureus* foi obtida pela redução exponencial do tamanho do *S. aureus* quando o fármaco livre e as concentrações dos complexos de inclusão foram acrescentados e pela neutralização gradual da carga da membrana celular. A DOX/ $\beta$ CD foi mais ativa contra *S. aureus* do que a DOX, sendo observada baixa citotoxicidade e maior proliferação de células de osteoblastos na presença de DOX/ $\beta$ CD quando comparado com a DOX. Estes resultados demonstraram que o mecanismo de ação da DOX, quando incluída no composto de inclusão, tornou-a mais eficaz na inibição bacteriana em baixas concentrações.

Apoio: CNPq e INCT/NANOBIOFAR.

6- 24<sup>TH</sup> ANNUAL SHORT COURSE ADVANTAGES IN TISSUE ENGINEERING, de 10 a 13 de Agosto de 2016. Rice University, Houston, Texas, USA.

**RESUMO: EFFECT OF DOXYCYCLINE GEL ENCAPSULATED IN B-CYCLODEXTRIN AS ADJUNCTIVE TOPICAL AGENT FOR THE TREATMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS: A RANDOMIZED CLINICAL TRIAL.**

Maria Esperanza Cortés<sup>1\*</sup>, Vivianne Carvalho da Cunha Trajano<sup>1</sup>, Célia Regina Moreira Lanza,<sup>2</sup> Rubén Dario Sinisterra<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

<sup>2</sup> Department of Dental Clinics, Oral Surgery and Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

<sup>3</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais,

**ABSTRACT**

**Aim:** to compare the clinical efficacy of 10% doxycycline encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin (DOX)/ $\beta$ CD) in gel with 10% DOX-alone gel along adjuvants with scaling and root planning (SRP) in a clinical trial. **Materials and Methods:** Thirty-three subjects with diagnosis of chronic periodontitis (CP) were randomized into: group I (GI) (10% DOX gel + SRP), group II (GII) (10% DOX /  $\beta$ -CD gel + SRP) that received application of the gels at T0 and T1, and group III (GIII), only SRP. The clinical signs of Periodontal Probing Depth (PPD), Clinical Attachment Level (CAL), bleeding on probing (BOP) and Visible Plaque Index (VPI) were evaluated at baseline (T0), 30 days (T1) and 60 days (T2). **Results:** Within the groups, GII presented the most significant reduction in the mean of PPD and BOP and the highest mean gain in CAL ( $p < 0.05$ ). When comparing the three groups, the GII presented a greater reduction in PPD (2.62 mm) ( $p < 0.003$ ) and reached the greatest number of individuals with a gain of clinical attachment (2.54 mm) at T2 ( $p < 0.003$ ). BOP and VPI had a strong reduction in all groups, comparing T2 with T0 ( $p < 0.05$ ). The VPI and BOP decreased  $\geq 5$  times and twice, respectively at T0 up to T1 in a similar way for all groups, without significant difference. **Conclusion:** the present study, even in short time, showed that the application of gel 10% DOX/ $\beta$ -CD associated with SRP showed significant improvement in the periodontal clinical parameters, in all protocols analyzed,

providing additional benefits to the SRP alone and treated subjects went for shallower periodontal pockets at the end of work. Therefore, the use of locally released doxycycline included in  $\beta$ -CD may be an important chemotherapeutic adjuvant in the treatment of chronic periodontitis.

Keywords: doxycycline,  $\beta$ -cyclodextrin, mucoadhesiveness, gels, chronic periodontitis.

**7- XIII ENCONTRO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS E X ENCONTRO MINEIRO DAS FACULDADES DE ODONTOLOGIA**, realizado na Faculdade de Odontologia da UFMG, nos dias 17 e 21 de outubro de 2016. Membro da Comissão Organizadora.

### **SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DOXICICLINA PARA O CONTROLE DA DOENÇA PERIODONTAL – ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO MASCARAMENTO.**

Vivianne Carvalho da Cunha TRAJANO<sup>1\*</sup>, Célia Regina M. LANZA<sup>2</sup>, Ruben Dario SINISTERRA<sup>3</sup>, Maria Esperanza CORTÉS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

<sup>2</sup> Department of Oral Clinical, Surgery and Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

<sup>3</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais.

Objetivo: avaliar a eficácia clínica do gel 10% DOX/ $\beta$ -CD (encapsulamento molecular da doxiciclina (DOX) com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD)) associado à raspagem e alisamento radicular (RAR) em pacientes com periodontite crônica (PC). Metodologia: os parâmetros clínicos profundidade à sondagem (PS); nível de inserção clínica (NIC); sangramento à sondagem (SS) e índice de placa visível (IPV), foram avaliados em

três tempos: T0 (baseline), T1 (30 dias) e T2 (60 dias). Em cada paciente, foram selecionados 2 molares homólogos. Os pacientes foram aleatorizados e divididos em três grupos. O grupo I (10% GEL DOX) e o grupo II (10% GEL DOX/ $\beta$ -CD) receberam uma aplicação do gel em T0 e em T1 e o grupo III, somente RAR. Resultados: na comparação dentro de cada grupo e considerando-se as diferenças das médias (T2-T0), o grupo II (RAR+GEL DOX/  $\beta$ -CD) apresentou maior redução média na PS e no SS e maior ganho médio no NIC ( $p < 0,05$ ), enquanto no IPV, o grupo III apresentou a maior redução média ( $p < 0,05$ ). Na comparação entre os grupos, o grupo II apresentou maior redução na PS em relação aos grupos I e III ( $p < 0,05$ ) e maior ganho de inserção em relação ao grupo III ( $p < 0,05$ ), mas não em relação ao grupo I. Não houve associação significativa no SS e no IPV porque as reduções dos grupos foram semelhantes. Conclusão: o GEL 10% DOX/ $\beta$ -CD associado à RAR apresentou melhoria significativa em todos os parâmetros clínicos quando comparados à RAR de forma isolada, sugerindo seu potencial no tratamento da PC, em especial nos casos refratários.

Palavras-chave: Doxíciclina. Géis Biodegradáveis. Doença Periodontal Crônica. Regeneração Óssea.

Apoio: CAPES, CNPq e INCT/NANOBIOFAR.

COEP: CAEE 32011214600005149

## **7.5 Participação em Eventos.**

**1- SIMPÓSIO DE ODONTOGERIATRIA PALESTRANTE DRA. MADELINE NAEGLE- NEW YORK UNIVERSITY**, realizado nos dias 11 e 12 de novembro de 2013, na Escola de Enfermagem da UFMG.

**2- JORNADA DA DOR ONCOLÓGICA**, realizado nos dias 19 e 20 de setembro de 2014, na Faculdade de Medicina da UFMG.

3- **SEMINÁRIO INTERNACIONAL ACUS DE GERIATRIA-NORD PAS DE CALAIS E MINAS GERAIS**, realizado nos dias 20 e 21 de novembro de 2014, no Hospital das Clínicas da UFMG.

4- **III SIMPÓSIO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**, realizado no dia 11 de junho de 2015. UFMG-BH.

5- **OFICINA “MITOS E VERDADES SOBRE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL”**, durante o **III SIMPÓSIO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**, realizado no dia 11 de junho de 2015. UFMG-BH.

6- **I FÓRUM CLÍNICO**, promovido pelo PROGRAMA DE EDUCAÇÃO PERMANENTE do CONSELHO REGIONAL DE ODONTOLOGIA DE MINAS GERAIS, realizado no(s) dia(s) 27 de Abril de 2016, no TEATRO DO CENTRO UNIVERSITÁRIO IZABELA HENDRIX - BELO HORIZONTE/MG, com carga horária de 8 h.

7- **SEMINÁRIO VIRTUAL TEMÁTICO INTITULADO OS AÇÚCARES DA DIETA E A SAÚDE INFANTIL**, com carga horária total de 2h, realizado em 20 de Março de 2014 pelo Núcleo de Telessaúde do Estado do Rio de Janeiro-Telessaúde UERJ, dentro do Programa Nacional de Telessaúde.

8- **SEMINÁRIO VIRTUAL TEMÁTICO INTITULADO RESTAURAÇÃO DE DENTES EXTENSAMENTE DESTRUÍDOS COM RESINA COMPOSTA E AMÁLGAMA**, com carga horária total de 2h, realizado em 22 de Maio de 2014 pelo Núcleo de Telessaúde do Estado do Rio de Janeiro-Telessaúde UERJ, dentro do Programa Nacional de Telessaúde.

9- **SEMINÁRIO VIRTUAL TEMÁTICO INTITULADO SENSIBILIDADE PÓS-OPERATÓRIA EM RESTAURAÇÕES DE AMÁLGAMA E RESINA COMPOSTA**, com carga horária total de 2h, realizado em 22 de Agosto de 2014 pelo Núcleo de Telessaúde do Estado do Rio de Janeiro-Telessaúde UERJ, dentro do Programa Nacional de Telessaúde.

10- **SEMINÁRIO VIRTUAL TEMÁTICO INTITULADO PERIODONTIA MÉDICA**, com carga horária total de 2h, realizado em 18 de Setembro de 2014 pelo Núcleo de Telessaúde do Estado do Rio de Janeiro-Telessaúde UERJ, dentro do Programa Nacional de Telessaúde.

11- **SEMINÁRIO VIRTUAL TEMÁTICO INTITULADO HALITOSE: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO AO ALCANCE DO CLÍNICO**, com carga horária total de 2h, realizado em 10 de Agosto de 2015 pelo Núcleo de Telessaúde do Estado do Rio de Janeiro-Telessaúde UERJ, dentro do Programa Nacional de Telessaúde, na qualidade de participante.

12- **II FÓRUM DE TERAPIAS COMPLEMENTARES**, promovido pelo PROGRAMA DE EDUCAÇÃO PERMANENTE do CONSELHO REGIONAL DE ODONTOLOGIA DE MINAS GERAIS, realizado no(s) dia(s) 21 de Outubro de 2016, no AUDITÓRIO II DO CRO-MG - BELO HORIZONTE/MG, com carga horária de 8 h.

13- **FÓRUM SOBRE CUIDADOS ODONTOLÓGICOS PARA COM O PACIENTE IRRADIADO EM REGIÃO DA CABEÇA E PESCOÇO**, realizado na Faculdade de Odontologia da UFMG, no dia 16 de dezembro de 2016, com carga horária de 10 horas totais.

14- **SEMINÁRIO VIRTUAL TEMÁTICO INTITULADO ALCOOLISMO E ENVELHECIMENTO**, com carga horária total de 2h, realizado em 20 de Março de 2012 pelo Núcleo de Telessaúde do Estado do Rio de Janeiro-Telessaúde UERJ, dentro do Programa Nacional de Telessaúde. Rio de Janeiro, 25 de Janeiro de 2017.

15- **SEMINÁRIO VIRTUAL TEMÁTICO INTITULADO O IDOSO E A ADESÃO AO TRATAMENTO DE CONDIÇÕES CRÔNICAS: ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR**, com carga horária total de 2h, realizado em 17 de Abril de 2012 pelo Núcleo de Telessaúde do Estado do Rio de Janeiro-Telessaúde

UERJ, dentro do Programa Nacional de Telessaúde. Rio de Janeiro, 25 de Janeiro de 2017.

## 7.6 Participação em Cursos:

1- Curso de extensão à distância: **ODONTOPEDIATRIA**- UERJ, 26 de julho de 2014. Carga horária: 15 horas.

2- Curso de extensão à distância: **ENVELHECIMENTO E A ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE DO IDOSO**- UERJ, 18 de setembro de 2014. Carga horária 15 horas.

3- Curso de extensão à distância: **TRATAMENTO RESTAURADOR ATRAUMÁTICO** - UERJ, 30 de setembro de 2014. Carga horária 15 horas.

4- Curso de extensão à distância: **SAÚDE VOCAL PARA PROFESSORES, ESCOLA DE SAÚDE PÚBLICA DE MINAS GERAIS**, setembro de 2014. Carga horária 20 horas.

5- Curso de extensão à distância: **TRAVESSIA EM SAÚDE, ESCOLA DE SAÚDE PÚBLICA DE MINAS GERAIS**, outubro de 2014. Carga horária 20 horas.

6- Curso **REALIZAÇÕES CLÍNICAS EM PERIO/PRÓTESE/IMPLANTE**, realizado no dia 08 de outubro de 2014, durante 12º CONGRESSO INTERNACIONAL DE ODONTOLOGIA DE MINAS GERAIS de 2014, BH-MG. Carga horária 08 horas.

7- Curso **PROMOÇÃO DE SAÚDE PARA PACIENTES ESPECIAIS PARA O CD, ASB E TSB**, promovido pelo PROGRAMA DE EDUCAÇÃO PERMANENTE do CONSELHO REGIONAL DE ODONTOLOGIA DE MINAS

GERAIS, realizado no(s) dia(s) 24 de Outubro de 2016, no AUDITÓRIO II DO CRO-MG - BELO HORIZONTE/MG, com carga horária de 3 h.

8- Curso **MARKETING DIGITAL PARA DENTISTAS: SAINDO DO ZERO E LEVANDO PACIENTES ATÉ A PORTA DO CONSULTÓRIO**, promovido pelo PROGRAMA DE EDUCAÇÃO PERMANENTE do CONSELHO REGIONAL DE ODONTOLOGIA DE MINAS GERAIS, realizado no(s) dia(s) 26 de Outubro de 2016, no AUDITÓRIO II DO CRO-MG - BELO HORIZONTE/MG, com carga horária de 3 h.

9- Curso **DESMISTIFICANDO O USO DA TOXINA BOTULÍNICA, PREENCHIMENTO FACIAL E EFEITO CINDERELA**, promovido pelo PROGRAMA DE EDUCAÇÃO PERMANENTE do CONSELHO REGIONAL DE ODONTOLOGIA DE MINAS GERAIS, realizado no(s) dia(s) 27 de Outubro de 2016, no AUDITÓRIO DO CRO-MG - BELO HORIZONTE/MG, com carga horária de 3 h.

### **7.7 Participação em banca examinadora de trabalhos monográficos do Curso de Especialização em Prótese Dentária da Faculdade São Leopoldo Mandic:**

1- Tema: Prótese dentária na identificação, controle e tratamento da disfunção temporomandibular: uma revisão de literatura.

Aluno: Daniel Passos Tenório.

Data: 15 de dezembro de 2015.

2- Tema: Aspectos mecânicos e biológicos dos pilares estéticos: uma revisão de literatura.

Aluna: Niliane de Oliveira Uchoa do Amaral.

Data: 29 de abril de 2016.

3- Tema: Afastamento gengival com pasta adstringente: um relato de caso clínico.

Aluna: Júlia Barros Mattar.

Data: 29 de abril de 2016.

4- Tema: Protocolo de Branemark: revisão de literatura.

Aluno: Thiago Rezende Paula.

Data: 29 de abril de 2016.

5- Tema: Tipos e escolhas de cerâmicas livres de metal para dentes posteriores: uma revisão de literatura.

Aluna: Hellen Guiomar Araújo Costa.

Data: 29 de abril de 2016.

### **7.8 Colaboração na elaboração de Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) de da Faculdade de Odontologia da UFMG.**

**Título: SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DOXICICLINA PARA O CONTROLE DA DOENÇA PERIODONTAL. RELATO DE CASO**

### **7.9 Participação na Organização de Eventos**

- 1- **XII ENCONTRO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS E X ENCONTRO MINEIRO DAS FACULDADES DE ODONTOLOGIA**, realizado na Faculdade de Odontologia da UFMG, nos dias 8, 9, 10 de maio de 2014. Membro da Comissão Organizadora.

- 2- **XIII ENCONTRO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS E X ENCONTRO MINEIRO DAS FACULDADES DE ODONTOLOGIA**, realizado na Faculdade de Odontologia da UFMG, nos dias 17 e 21 de outubro de 2016. Membro da Comissão Organizadora.