



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DA ACETAZOLAMIDA NA**  
**DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

**TERCIO CARNEIRO RAMOS**

**Fortaleza**

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**TERCIO CARNEIRO RAMOS**

**AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DA ACETAZOLAMIDA NA DOENÇA  
PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Getulio Nogueira Filho**

**Fortaleza**

**2010**

**TERCIO CARNEIRO RAMOS**

**AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DA ACETAZOLAMIDA NA DOENÇA  
PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

Tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

Aprovada em 30 de junho de 2010.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes  
(Orientadora da Tese)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Isaac Suzart Gomes Filho  
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

---

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra  
Universidade Federal do Ceará – UFC / Sobral

---

**DEDICATÓRIA**

## **DEDICATÓRIA**

Porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!

Romanos 11:36  
Sem Jesus nada podemos fazer

---

## **AGRADECIMENTOS**

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir uma jornada desta e olhar para trás é nítido ver Deus movendo pessoas e circunstâncias para que este produto fosse concluído. A gratidão é imensa, pois sem os apoios recebidos uma tarefa desta seria humanamente impossível, como não agradecer:

A Emilia, minha amada esposa por ser minha ajudadora idônea, minha outra metade, apoiadora sempre presente em toda circunstância.

Ao João Victor e André, meus filhos, com suas existências me motivaram a ser persistente.

A Dra. Elisabete por ter me aceito como orientando, ter me recebido em 2002 no mestrado, aberto portas e conhecido pessoas tão importantes no mundo da Farmacologia.

Como não agradecer ao Prof Odorico pelo bom humor e exemplo de Professor que muito me ajudou a elaborar aulas.

Aos meus pais Ramalho e Glória, que investiram em mim desde a infância e se orgulham das vitórias.

Ao Getulio, pelas correções e sugestões na tese, na qualificação e elaboração do paper, e por palavras de estímulo.

À Sibebe, pelo bom humor e grande disposição na elaboração das lâminas e interpretação histopatológica.

A Songeli, Patrícia Veiga e Rosalina nas dosagens com o microarray.

A Danilo Avelar e Paula Schons na manipulação com os animais sem ter dia ou noite, sábados, domingos e feriados com dedicação e apreço.

Aos alunos Danilo Alves, Fernando e Jéferson pela colaboração voluntária na finalização da pesquisa.

Aos funcionários da UNIFAC: Malu, Teresa, Fábria e Prof. Vagnaldo pela sempre atenciosa e paciente atenção.

À Aurea pelo carinho, atenção e disposição em resolver problemas, que Deus cuide bem de você.

Aos meus irmãos em Cristo que me ajudaram em oração, especialmente Marinalva e Iracema.

A você, que eu esqueci, mas no secreto contribuiu de alguma forma, meus AGRADECIMENTOS.



## RESUMO

**Avaliação de eficácia e segurança da acetazolamida na doença periodontal experimental.** Tercio Carneiro Ramos. Orientadora: Maria Elisabete Amaral de Moraes. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2010.

As doenças periodontais são as principais causas de perda de dentes em adultos. O fator etiológico preponderante para desencadear a periodontite é o acúmulo do biofilme dental com predominância de bactérias anaeróbicas gram negativas. Apesar de ser de origem bacteriana a resposta inflamatória induzida a partir de fatores do hospedeiro pode influenciar na progressão e nas características clínicas da doença periodontal. A perda óssea alveolar é típica na evolução desta patologia e dependente da atividade osteoclástica. Por sua vez, um dos mecanismos de reabsorção óssea por estas células é através da produção de prótons liberados nos vacúolos de reabsorção pela atividade da anidrase carbônica. Tem sido relatado que inibidores desta enzima, como acetazolamida, tem ação supressora sobre osteoclastos. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da acetazolamida (ACTZ) na perda óssea induzida no modelo de periodontite experimental em ratos, bem como a dosagem de biomarcadores séricos do processo inflamatório periodontal e análise histológica do periodonto. Análises de segurança também foram realizadas através de hemograma completo, dosagens de TGP, TGO, gama-GT e histopatologia de órgãos como: fígado, rins, baço, coração e pulmão. Para avaliação da perda óssea alveolar 50 ratos receberam ligaduras de nylon na região do segundo molar superior esquerdo. Os animais foram divididos em seis grupos: Grupo veículo (propilenoglicol) (n=9), grupo controle positivo (alendronato 0,08 mg/Kg) (n=7), grupo controle negativo (salina) (n=9) e grupos que receberam acetazolamida via I.P. nas doses (8,3, 25 e 75 mg/Kg [grupos ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75, respectivamente] n= 7, 9 e 9). Após 11 dias, os ratos foram mortos. A perda óssea alveolar foi avaliada macroscopicamente através da área de exposição de raiz. Em outros quatro grupos, ACTZ25 (n=5) e veículo (n=5), o periodonto foi analisado histologicamente após 11 e 17 dias de ligadura por coloração em HE. Biomarcadores séricos foram dosados (IL-1 $\alpha$ , IL-4, fractalkine, CINC-2, CINC-3, LIX, GM-CSF,  $\beta$ NGF, VEGF e CNTF) através da técnica de microarray antes e depois da ligadura em três grupos; ACTZ25, Veículo e Sham (cirurgia simulada). No grupo de ACTZ25 foi realizada a análise de segurança ( $\alpha=5\%$ ). Macroscopicamente, o grupo alendronato (controle positivo) apresentou a menor perda óssea, seguido do grupo ACTZ75 e ACTZ25 ( $p<0.05$ ) quando comparados aos controles veículo e salina que não diferiram entre si ( $p>0.05$ ). Histologicamente, o grupo ACTZ apresentou a menor reabsorção de osso e cimento ( $p<0,05$ ) após 17 dias de ligadura, não houve diferença entre o grupo ACTZ25 e o veículo quanto ao infiltrado inflamatório ( $P>0,05$ ). As maiores concentrações de IL-4 e CNTF foram observadas no grupo ACTZ25 ( $p< 0,05$ ) quando comparado ao grupo veículo. As análises de segurança demonstraram que acetazolamida na dosagem de 25 mg/Kg foi bem tolerada sem alterações significativas do hemograma, nas enzimas hepáticas e histopatologia dos órgãos pesquisados. Concluímos que a acetazolamida pode proteger o periodonto da reabsorção óssea induzida por ligadura em ratos e pode estar associada a mediadores envolvidos com o reparo, como a IL-4 e CNTF, além de ser bem tolerada.

**Palavras-chaves:** acetazolamida, doença periodontal, perda óssea alveolar.

---

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

**Efficacy and safety assessment of acetazolamide in experimental periodontal disease.** Tercio Carneiro Ramos. Supervisor Maria Elisabete Amaral de Moraes. Doctoral Thesis. Postgraduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza- Ce, Brazil, UFC, 2010.

Periodontal diseases are the main cause of tooth loss in adults. The preponderant etiologic factor for the onset of periodontitis is the accumulation of dental biofilm with predominance of anaerobic gram negative bacteria. In spite of being of bacterial origin, the inflammatory response induced by factors in the host may influence the progression and clinical characteristics of periodontal disease. Alveolar bone is typical in the development of this pathology and is dependent on osteoclastic activity. In turn, one of the mechanisms of bone resorption by these cells is through the production of protons released in the resorption vacuoles by carbonic anhydrase activity. It has been reported that carbonic anhydrase inhibitors, such as acetazolamide, have a suppressive action on osteoclasts. The aim of this study was to analyze the effect of acetazolamide (ACTZ) on bone loss induced in the experimental periodontitis model in rats, as well as the dosage of seric biomarkers in the periodontal inflammatory process and histologic analysis of the periodontium. Safety analyses were also performed by means of a complete hemogram, biochemical tests for TGP, TGO, gama-GT and histopathology of organs such as: the liver, kidneys, spleen, heart and lungs. To evaluate alveolar bone loss, 50 rats received nylon ligatures in the maxillary left second molar region. The animals were divided into six groups: Vehicle Group (propylenoglycol) (n=9), Positive Control Group (alendronate 0.08 V (n=7), Negative Control Group (saline) (n=6) and Groups that received acetazolamide I.P. in the following doses: (8.3, 25 and 75 mg/Kg [Groups ACTZ8,3, ACTZ25 and ACTZ75 respectively] n= 7, 9 and 9). After 11 days, the rats were sacrificed. Alveolar bone loss was macroscopically evaluated by means of the area of root exposure. In another four groups, ACTZ25 (n=5) and vehicle (n=5), the periodontium was histologically analyzed after 11 and 17 days of ligature, by HE staining. Seric biomarkers were dosed (IL-1 $\alpha$ , IL-4, fractalkine, CINC-2, CINC-3, LIX, GM-CSF,  $\beta$ NGF, VEGF and CNTF) by means of the microarray technique before and after ligature in three groups; ACTZ25, Vehicle and Sham (simulated surgery). In the ACTZ25 group, safety analysis was performed ( $\alpha=5\%$ ). Macroscopically, the alendronate Group (positive control) presented the lowest bone loss, followed by Groups ACTZ75 and ACTZ25 ( $p<0.05$ ) when compared with the vehicle and saline controls, which did not differ between them ( $p>0.05$ ). Histologically, the ACTZ group presented the lowest bone and cement resorption ( $p<0.05$ ) after 17 days of ligature, and there was no difference between the ACTZ25 and vehicle groups with regard to inflammatory infiltrate ( $P>0.05$ ). The highest concentrations of IL-4 and CNTF were observed in Group ACTZ25 ( $p< 0.05$ ) when compared with the vehicle group. The safety analyses demonstrated that acetazolamide at the dose of 25 mg/Kg was well tolerated without significant alterations in the hemogram, hepatic enzymes and histopathology of the researched organ. It was concluded that acetazolamide may protect the periodontium from bone resorption induced by ligature in rats, and may be associated with mediators involved in repair, such as IL-4 and CNTF, in addition to being well tolerated.

**Key Words:** acetazolamide, periodontal disease, alveolar bone loss.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µm</b>	micrômetros
<b>1,25 (OH)2D3</b>	1,25 dihidroxivitamina D3
<b>ab</b>	<i>Alveolar bone</i> = osso alveolar
<b>AC</b>	Anidrase carbônica
<b>ACTZ</b>	Acetazolamida
<b>AINES</b>	Antiinflamatórios não esteroidais
<b>AMPc</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> adenosina monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i> = Análise de variância
<b>AP-1</b>	<i>Activator protein- 1</i> = ativador de proteína-1
<b>ARO</b>	Área média de reabsorção óssea
<b>B</b>	Bronquíolo
<b>BID</b>	Lat. <i>bis in die</i> = duas vezes ao dia
<b>c-Fms</b>	proto-oncogene fms - codifica o receptor de M-CSF
<b>c-Fos</b>	Gene c-Fos
<b>CINC-2</b>	<i>Cytokine-induced neutrophil chemotactic factors 2</i> Citocina quimiotática indutora de neutrófilos 2
<b>CINC-3</b>	<i>Cytokine-induced neutrophil chemotactic factors 3</i> Citocina quimiotática indutora de neutrófilos 3
<b>CNTF</b>	<i>Ciliar neurotrophic factor</i> Fator neurotrófico ciliar
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>CR</b>	Corpúsculo renais
<b>d</b>	Dentina
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid Ácido desoxirribonucléico
<b>DNase</b>	<i>Deoxyribonuclease</i> Desoxirribonuclease
<b>DP</b>	Doença periodontal
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> Ácido etilenodiamino tetra-acético

<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> Ensaio imuno-absorvente ligado à enzima
<b>eNOS</b>	<i>Endothelial nitric oxide sintetase</i> Óxido nítrico sintetase
<b>ep</b>	Epitélio de revestimento
<b>FMC</b>	Fibras musculares cardiacas
<b>g</b>	Gengiva
<b>gama GT</b>	Gama glutamil transferase
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago
<b>h</b>	Hemácias
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>ici</b>	<i>Inflammatory celular infiltration</i> Infiltrado celular inflamatório
<b>IL-1</b>	Interleucina –1
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina –1 alfa
<b>IL-10</b>	Interleucina –10
<b>IL-11</b>	Interleucina –11
<b>IL-12</b>	Interleucina –12
<b>IL-17</b>	Interleucina –17
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina –1 beta
<b>IL-4</b>	Interleucina –4
<b>IL-6</b>	Interleucina –6
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide sintetase</i> Óxido nítrico sintetase
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>JCE</b>	Junção cimento esmalte
<b>LIF</b>	<i>Leukemia inhibitory factor</i> Fator inibidor de leucemia
<b>LIX</b>	<i>LPS-induced chemokine</i> Quimiocina induzida por LPS
<b>L-NAME</b>	<i>L-Nitro-Arginine Methyl Ester</i> L-nitro-arginina metil ester

<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LXA<sub>4</sub></b>	lipoxinas A <sub>4</sub>
<b>LXB<sub>4</sub></b>	lipoxinas B <sub>4</sub>
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>ml</b>	Músculo liso
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetro quadrado
<b>MMP</b>	Metaloproteinase de matriz
<b>MMP- 1</b>	Metaloproteinase de matriz-1
<b>MMP- 3</b>	Metaloproteinase de matriz-3
<b>MMP- 8</b>	Metaloproteinase de matriz-8
<b>MMP- 9</b>	Metaloproteinase de matriz-9
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NOS</b>	<i>Nitric oxide sintetase</i> ; Óxido nítrico sintetase
<b>NGF</b>	<i>Neuronal grow factor</i> ; Fator de crescimento neuronal
<b>NTx</b>	N-Telopeptídeo de ligação inter-fibras colágenas
<b>OPG</b>	<i>Osteoprotegerin</i> ; Osteoprotegerina
<b>PB</b>	Polpa branca
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i> Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>pg/mL</b>	Picograma por mililitro
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	Proteínaquinase A
<b>pl</b>	<i>Ligament periodontal</i> Ligamento periodontal
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares neutrófilos
<b>PPAR-Gamma</b>	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i> Receptor ativado por proliferadores do peroxisoma
<b>PTH</b>	Paratormônio
<b>PV</b>	Polpa vermelha

<b>PVC</b>	<i>Polyvinyl chloride</i> Cloreto de polivinila
<b>RAR</b>	Raspagem a alisamento radicular
<b>RANK</b>	<i>Receptor Activator for Nuclear Factor <math>\kappa</math> B</i> Receptor ativador do fator nuclear-kBETA
<b>RANKL</b>	<i>Receptor Activator for Nuclear Factor <math>\kappa</math> B Ligand</i> Ligante do receptor ativador do fator nuclear-kBETA
<b>RNA<sub>m</sub></b>	<i>Messenger ribonucleic acid</i> Ácido ribonucléico mensageiro
<b>RNase</b>	<i>Ribonuclease</i> Ribonuclease
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>TCD</b>	Tubulos contorcidos distais
<b>TCP</b>	Tubulos contorcidos proximais
<b>TGF<sub>β</sub></b>	<i>Transforming growth factor-β</i> Fator de crescimento transformador- β
<b>TGO</b>	Transaminase glutâmico oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase glutâmico pirúvica
<b>TNF<sub>α</sub></b>	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> Fator de necrose tumoral alfa
<b>U/L</b>	Unidade por litro
<b>V</b>	Vasos
<b>VC</b>	Veia central
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i> Fator de crescimento endotelial vascular
<b>β-NGF</b>	<i>Beta nerve growth factor</i> Fator de crescimento neuronal beta
<b>μL</b>	Microlitro

---

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Valores da média e desvio padrão da área de reabsorção óssea referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle, Veículo, Alendronato, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75.-----65

**TABELA 2.** Análise histológica do periodonto de ratos com periodontite. Mediana e intervalo interquartil dos escores do infiltrado inflamatório e da preservação do periodonto. -----66

**TABELA 3.** Valores da mediana e intervalo interquartil de biomarcadores (pg/mL) referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Veículo, Sham e ACTZ25 em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 4 (pré) e 6 (pós) ratos do grupo Sham. -----69

**TABELA 4.** Valores da média e desvio padrão de biomarcadores (pg/mL) referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Veículo, Sham e ACTZ25 em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 4 (pré) e 6 (pós) ratos do grupo Sham. -----70

**TABELA 5.** Média e desvio padrão do peso dos animais por dias de avaliação segundo o grupo. -----90

---

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Reação entre a H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> com e sem a presença da anidrase carbônica. -----38
- FIGURA 2.** Cirurgia de ligadura em maxila de rato com fio de nylon 000 sendo passado entre o segundo e terceiro molar esquerdos para indução de periodontite----51
- Figura 3.** Desenho do estudo de medida de perda óssea análise de segurança em ratos-----52
- FIGURA 4.** Desenho do estudo da histopatologia do periodonto em dois momentos.-53
- FIGURA 5.** Desenho do estudo da dosagem de biomarcadores séricos-----53
- FIGURA 6.** Fotografia de maxilas dissecadas mecânica e quimicamente de ratos com doença periodontal transiluminadas para destacar a JCE (seta branca). Foto A representativa do grupo ACTZ75. Foto B representativa do grupo veículo. -----54
- FIGURA 7.** Fotografia de maxila de rato com medida da área de exposição de raiz em mm<sup>2</sup> pelo programa Motic Images® 3.0 -----54
- FIGURA 8.** Desenho esquemático mostrando estrutura de detecção de citocinas posicionadas em quadruplicata e seqüência de ordenação de anticorpos do microarray de proteínas-----55
- FIGURA 9.** Chip de vidro delimitado por um suporte plástico formando 16 poços para dosagem de citocinas por Microarray. -----56
- FIGURA 10.** Diluições seriadas do padrão de citocinas para construção da curva padrão. -----56
- FIGURA 11.** Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Veículo, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo ACTZ25 e 9 ratos dos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ75 (\*p<0,05). -----63
- FIGURA 12.** Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Alendronato, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais dos grupos Alendronato e ACTZ25 e 9 ratos dos grupos ACTZ8,3 e ACTZ75 (p>0,05). -----63

**FIGURA 13.** Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Controle e Alendronato. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 9 animais do grupo Controle e 7 ratos do grupo Alendronato (\*\*p<0,05).-----63

**FIGURA 14.** Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Controle e Veículo. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 9 animais de cada grupo (p>0,05).-----64

**FIGURA 15.** Avaliação da eficácia dos tratamentos com Alendronato, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75, expressão em termos percentuais, definida como o percentual de redução da área média de reabsorção óssea (ARO) dos seus respectivos controles, conforme a seguinte expressão:

$$Eficácia(\%) = \frac{ARO(\text{controle}) - ARO(\text{fármaco})}{ARO(\text{controle})} \cdot 100, \text{ onde ARO corresponde à área}$$

média de reabsorção óssea e controle diz respeito aos grupos Controle (Alendronato) ou Veículo (ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75).-----64

**FIGURA 16.** Fotomicrografia representativa de periodonto de rato sem doença. B, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam veículo mostrando zonas de reabsorção do cimento (setas pretas). C, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam ACTZ 25mg/Kg mostrando infiltrando inflamatório moderado e parcial preservação do processo alveolar e cimento. Estudo de 11 dias. (g= gengiva, ab= osso alveolar, d= dentina, pl= ligamento periodontal, ici= infiltrado inflamatório, H&E; aumento original 100X, Barra =300µm). -----66

**FIGURA 17. A** Fotomicrografia representativa de periodonto de rato sem doença. **B**, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam veículo mostrando ausência de infiltrado e total reabsorção do processo alveolar e moderada reabsorção do cimento **C**, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam ACTZ 25mg/Kg mostrando ausência de infiltrando inflamatório e parcial preservação do periodonto. Estudo de 17 dias. (H&E; aumento original 100X, Barra =300µm).-----67

**FIGURA 18.** Contagem de hemácias realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 (p>0,05). -----71

**FIGURA 19.** Contagem de hemácias realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3 (\*p=0,0194). -----72

**FIGURA 20.** Concentração de hemoglobina mensurada nas fases de pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25, ( $p > 0,05$ ). -----72

**FIGURA 21.** Concentração de hemoglobina mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais dos grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25. Veículo (\* $p = 0,0107$ ), ACTZ8,3 (\* $p = 0,0265$ ), ACTZ25 (\* $p = 0,0445$ ) -----73

**FIGURA 22.** Valores do hematócrito mensurados no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ). -----73

**FIGURA 23.** Valores do hematócrito mensurados no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25 considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3 (\* $p = 0,0464$ ). -----74

**FIGURA 24.** Contagem de leucócitos realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos em nenhuma das fases ( $p > 0,05$ ). -----76

**FIGURA 25.** Contagem de leucócitos realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais dos grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25 Observou-se que, nos três grupos, o número de leucócitos verificado no pós-tratamento foi significativamente maior que o observado no pré-tratamento: Veículo (\* $p = 0,0434$ ), ACTZ8,3 (\*\* $p = 0,0093$ ), ACTZ25 (\* $p = 0,0132$ ). -----77

**FIGURA 26.** Quantificação de neutrófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ). -----77

**FIGURA 27.** Quantificação de neutrófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados

expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais dos grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25. Veículo (\*\*p = 0,0017) e ACTZ25 (\*p = 0,0135). -----78

**FIGURA 28.** Quantificação de eosinófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 (p>0,05). -----78

**FIGURA 29.** Quantificação de eosinófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3. Entretanto, na análise intragrupo, observou-se que, nos grupos Veículo (\*p=0,0267) e ACTZ8,3 (\*\*p=0,0007), houve uma redução significativa dos eosinófilos no pós-tratamento em relação à fase de pré-tratamento. -----79

**FIGURA 30.** Quantificação de linfócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 (p>0,05). -----79

**FIGURA 31.** Quantificação de linfócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3. Observou-se que, nos grupos Veículo (\*\*p=0,0049) e ACTZ25 (\*p=0,0141). -----80

**FIGURA 32.** Quantificação de basófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25.(p>0,05. ACTZ25 foi significativamente maior (\*p<0,05) que aqueles observados nos grupos Veículo e ACTZ8,3. -----80

**FIGURA 33.** Quantificação de basófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3 (p>0,05). -----81

**FIGURA 34.** Quantificação de monócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7

(pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 (p>0,05). -----81

**FIGURA 35.** Quantificação de monócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25 (p>0,05). -----82

**FIGURA 36.** Contagem de plaquetas realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 (p>0,05). -----82

**FIGURA 37.** Contagem de plaquetas realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25 considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais dos grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25. (Teste *t* para dados emparelhados). Constatou-se que, nos grupos Veículo (\*p = 0,0369) e ACTZ8,3 (\*p = 0,0413), houve um aumento significativo no número de plaquetas no pós-tratamento em relação à fase de pré-tratamento. -----83

**FIGURA 38.** Concentração sanguínea de TGP mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 (pré) e 6 (pós) animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 9 (pré) e 7 (pós) animais do grupo ACTZ25 (p>0,05).-----84

**FIGURA 39.** Concentração sanguínea de TGP mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupo Veículo, 7 ratos do grupo ACTZ8,3 e 6 animais do grupo ACTZ25. Constatou-se que, nos grupos ACTZ8,3 (\*p = 0,0103) e ACTZ25 (\*p = 0,0173), houve uma diminuição significativa na concentração de TGP no pós-tratamento em relação à fase de pré-tratamento. -----84

**FIGURA 40.** Concentração sanguínea de TGO mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 (pré) e 6 (pós) animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 9 (pré) e 7 (pós) animais do grupo ACTZ25. (p>0,05).-----85

**FIGURA 41.** Concentração sanguínea de TGO mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio

padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupo Veículo, 7 ratos do grupo ACTZ8,3 e 6 animais do grupo ACTZ25. ( $p > 0,05$ ).-----85

**FIGURA 42.** Concentração sanguínea de gama glutamil-transferase (GGT) mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 (pré) e 6 (pós) animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 9 (pré) e 7 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).-----86

**FIGURA 43.** Concentração sanguínea de gama glutamil-transferase (GGT) mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupo Veículo, 7 ratos do grupo ACTZ8,3 e 6 animais do grupo ACTZ25. Constatou-se que, nos três grupos, a concentração de GGT no pré-tratamento foi significativamente maior que a observada no pós-tratamento: Veículo ( $***p = 0,0005$ ), ACTZ8,3 ( $***p = 0,0001$ ), ACTZ25 ( $**p = 0,0079$ ). -----86

**FIGURA 44.** Corte longitudinal apresentando as características histológicas típicas da superfície interna do coração na porção subendocárdica, miocárdio, com fibras musculares cardíacas (FMC) alongadas e mononucleadas, contendo núcleo central (seta). Entre as fibras há tecido conjuntivo de preenchimento fracamente corado (endomísio) com núcleos menores (ponta de seta). No tecido conjuntivo estão presentes pequenos vasos (V) com hemácias (h). Aumento de 400x; coloração de rotina em hematoxilina e eosina (HE). -----87

**FIGURA 45.** Corte transversal de um lóbulo hepático evidenciando veia central ou vênula hepática terminal (VC); as células hepáticas (hepatócitos) seccionadas aparecem como cordões interconectantes de um ou mais hepatócitos poligonais com núcleos esféricos centrais (seta), constituindo cerca de 80% da população de células do fígado. Os sinusóides (ponta de seta) aparecem como áreas claras entre os cordões de células. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE. -----87

**FIGURA 46..** Fotomicrografia mostrando a porção respiratória da árvore brônquica. Visualização de um bronquíolo (B) em corte transversal com parede contendo epitélio de revestimento (ep) e feixes de músculo liso (ml). Nesta parede, o tecido conjuntivo é mínimo neste aumento, não sendo evidenciado. Apesar disto ele está presente e separa o músculo em feixes (isto é, a camada muscular não é uma camada contínua única). Circundando o bronquíolo, compreendendo a maior parte da substância pulmonar, estão os ductos alveolares (seta) e alvéolos (ponta de seta), que são espaços aéreos circundados pela parede alveolar. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE.-----88

**FIGURA 47.** Fotomicrografia de um corte do córtex renal contendo corpúsculos renais (CR), que aparecem como estruturas esféricas relativamente grandes, e seus túbulos contorcidos distais (TCD) e proximais (TCP) associados. Ao contrário dos túbulos distais, os proximais exibem borda em escova com diâmetro externo maior, e muitos mostram uma luz estrelada. Os túbulos contorcidos, sobretudo os proximais, em virtude de suas tortuosidades apre xx 1-se em vários perfis, a maioria dos

quais é oval ou circular, outros mais alongados ou em diferentes formas. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE. -----88

**FIGURA 48.** Fotomicrografia do baço revelando seus dois componentes principais, a polpa vermelha (PV) e a polpa branca (PB); a polpa vermelha constitui a maior parte do tecido esplênico. A polpa branca contém um tecido linfático que acompanha e envolve a artéria central (seta). A expansão da polpa branca cria os nódulos esplênicos. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE.-----89





## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	<b>32</b>
<b>1.1 A Doença periodontal</b>	<b>32</b>
<b>1.2 Osteoclastos e a reabsorção óssea</b>	<b>35</b>
<b>1.3 A Anidrase Carbônica</b>	<b>37</b>
<b>1.4 Modulação da perda óssea alveolar e do processo inflamatório periodontal por medicações sistêmicas</b>	<b>39</b>
<b>1.5 A acetazolamida</b>	<b>44</b>
<b>1.6 Biomarcadores</b>	<b>45</b>
<b>2.0 JUSTIFICATIVA</b>	<b>47</b>
<b>3.0 OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Geral</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Específicos</b>	<b>49</b>
<b>4.0 MATERIAIS e MÉTODOS</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Animais</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Modelo de Periodontite Experimental</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Fármacos e tratamentos</b>	<b>52</b>
<b>4.4 Medida da perda óssea alveolar</b>	<b>53</b>
<b>4.5 Dosagens de biomarcadores inflamatórios séricos por microarray de proteínas</b>	<b>54</b>
<b>4.5.1 Procedimentos de bloqueio e incubação</b>	<b>57</b>
<b>4.5.2 Preparação da lâmina para detecção da fluorescência</b>	<b>57</b>
<b>4.6 Análise histológica do periodonto</b>	<b>58</b>
<b>4.7 Análise dos parâmetros sistêmicos (ou do Perfil de segurança)</b>	<b>58</b>
<b>4.7.1 Estudo bioquímico e hematimetria</b>	<b>58</b>
<b>4.7.2 Análise histológica de órgãos</b>	<b>59</b>
<b>4.8 Análise estatística</b>	<b>59</b>
<b>5.0 RESULTADOS</b>	<b>62</b>
<b>5.1 Medidas da perda óssea alveolar</b>	<b>62</b>
<b>5.2 Análise histológica do periodonto</b>	<b>65</b>
<b>5.3 Dosagem de biomarcadores séricos por microarray</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Análise dos parâmetros sistêmicos (ou do Perfil de segurança)</b>	<b>70</b>
<b>5.4.1 Hematimetria eritrocitária</b>	<b>70</b>

<b>5.4.2 Série leucocitária</b>	<b>75</b>
<b>5.4.3 Dosagens de enzimas hepáticas</b>	<b>83</b>
<b>5.4.4 Histopatologia dos órgãos</b>	<b>87</b>
<b>5.4.5 Medida dos pesos dos animais</b>	<b>89</b>
<b>6.0 DISCUSSÃO</b>	<b>92</b>
<b>7.0 CONCLUSÃO</b>	<b>104</b>
<b>8.0 REFERÊNCIAS CONSULTADAS</b>	<b>106</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>120</b>



## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 A Doença periodontal

O periodonto, que recebe este nome por representar os tecidos que se situam em torno (peri) do dente (odonto), compreende as seguintes estruturas: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. O desenvolvimento dos tecidos periodontais ocorre na fase embrionária de crescimento e formação dos dentes e a sua principal função é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral (LINDHE, KARRING, 1992; SAMPAIO *et al.*, 2005).

A doença periodontal (DP) é uma das doenças mais comuns do ser humano, afetando de 5 a 30% da população adulta na faixa etária de 25 a 75 anos e situa-se entre a principal causa de perda dos dentes em adultos (COHEN, MEALEY, 2002). Consiste em um processo patológico de caráter imunoinflamatório que promove o rompimento da homeostasia dos tecidos periodontais e que é desencadeado por um fator etiológico primário, o biofilme dental bacteriano, que por sua vez, é bastante peculiar e composto, sobretudo por espécies bacterianas gram negativas como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivallis* (Pg), *Campilobacter rectus* (Cr), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Prevotella intermedia* (Pi).

Mesmo em países como a Dinamarca, onde o sistema de saúde apresenta indicadores melhores do que países em desenvolvimento, apenas 7,7 % dos indivíduos com 35 a 44 anos e 2,2 % dos indivíduos entre 65 e 74 anos de uma amostra de 1115 indivíduos, apresentavam periodonto saudável de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (KRUSTRUP; ERIK PETERSEN, 2006).

Clinicamente, a DP se apresenta associada aos sinais clássicos de um processo inflamatório, como sangramento à sondagem ou espontâneo, edema, (TUNES *et al.*, 2005; TAUBMAN *et al.*, 2007) eritema difuso e supuração, e pode estar confinada ao periodonto de proteção (gengiva ou mucosa ceratinizada), caracterizando o quadro

de gengivite, ou estender-se ao periodonto de suporte (ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular), caracterizando a periodontite, onde clinicamente ocorre não só o envolvimento do tecido gengival, mas também se observa a presença de bolsas periodontais pelo aprofundamento patológico do sulco gengival, perda de inserção e reabsorção óssea alveolar, levando, em última instância, à mobilidade dental, migração patológica e perda dentária (CIANCIO, ASHLEY, 1998).

A classificação da DP quanto à evolução clínica e progressão esta dividida em crônica ou agressiva. A primeira é mais prevalente e relaciona-se aos sinais “clássicos” de inflamação, onde o cálculo subgengival é um achado comum como fator predisponente local. O seu progresso é caracterizado por evolução clínica com episódios de “mini-surtos” de exacerbação seguido por períodos de quiescência. (GONÇALVES *et al.*, 2005).

Acrescenta-se que, o hospedeiro assume grande responsabilidade nesse processo, uma vez que os danos teciduais ocorrem devido às reações que envolvem a geração de mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PG), citocinas, fatores de crescimento, elaboração de enzimas líticas, além do recrutamento de células inflamatórias e ativação de osteoclastos, que formam a base da destruição tecidual (WAHL, CORCORAN, 1993; ASSUMA *et al.*, 1998; TUNES *et al.*, 2005; KANER *et al.*, 2007).

A invasão bacteriana pode agredir o periodonto tanto por uma ação direta através do LPS (lipossacarídeos) presente na parede de bactérias gram-negativas, toxinas e enzimas secretadas, bem como indiretamente através da resposta do hospedeiro. Apesar de ser de origem bacteriana a resposta inflamatória induzida a partir de fatores do hospedeiro adquiridos e genéticos podem influenciar na progressão e nas características clínicas da doença periodontal que varia de um indivíduo para outro (AAP, 2003). Recentes pesquisas têm demonstrado que o tratamento direcionado à modulação da inflamação é tão importante quanto o antimicrobiano (ARMITAGE; ROBERTSON, 2009).

Colonização por periodontopatógenos pode resultar na destruição dos tecidos pela ativação de uma ou mais das cinco vias distintas de degradação (via das

metaloproteinases de matriz, via plasminogênio-dependente, via fagocítica, via serina PMN-proteinase e reabsorção óssea osteoclástica) ou por clivagem direta de componentes da matriz extracelular por proteinases microbianas (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). A invasão de patógenos gram-negativos associados ao biofilme dental estimula a resposta imunoinflamatória do hospedeiro. Esta resposta pode ser protetora quando produz migração de neutrófilos, anticorpos protetores e citocinas antiinflamatórias como as interleucinas (IL) IL-4, IL-10, IL-12 e Fator de crescimento transformador beta ( $TGF\beta$ ), porém a persistência da agressão pode levar a perda de tecido mole, destruição óssea alveolar progressiva, mobilidade e até mesmo a perda do dente por exposição radicular devido à reabsorção do periodonto. Lipopolissacarídeos de membrana (LPS) de gram-negativos desencadeiam o recrutamento de polimorfonucleados para o local, monócitos e macrófagos ativados liberam então várias citocinas pró-inflamatórias principalmente, IL-1 $\beta$  e Fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), que agem diretamente na inicialização do processo destrutivo, tanto do tecido ósseo por catepsinas e metaloproteinases de matriz (MMP) produzidas por osteoclastos, bem como, outras collagenases intersticiais que atuam no tecido mole. Fibroblastos e PMN (polimorfonucleados neutrófilos) também podem liberar MMP's. O conhecimento da fisiopatologia da DP e o entendimento de que a manipulação da resposta do hospedeiro pode alterar o curso da doença tem aberto linhas de pesquisa possibilitando a associação de medicamentos sistêmicos juntamente com o tratamento convencional de raspagem e alisamento radicular (CLARK, LÖE, 1993; ORINGER, R.J.- AAP, 2002; PIHLSTROM et al., 2005; GIANOBILE, 2008).

Atualmente também se tem dado importância a associação com fatores de risco (fumo, diabetes, estresse, etc.) e polimorfismos de vários genes que controlam a produção de interleucinas e fibrinogênio. Sabe-se que em alguns indivíduos o processo inflamatório expande-se por motivos ainda não claros, envolvendo a degradação de colágeno no ligamento periodontal e a reabsorção óssea (SCANNAPIECO, 2004).

A perda óssea induzida pela DP envolve a participação de diversas células e moléculas que interagem entre si, principalmente osteoblastos e osteoclastos. Sendo, estes últimos, células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea

de origem hematopoiética e do estroma da medula óssea da linhagem monócito-macrófago (TAKAHASHI et al., 1994 RAMALHO et al., 2000; BLAIR E ATHANASOU, 2004). Esta destruição pode chegar a reduzir 1mm de osso alveolar por ano em adultos sem nenhuma informação sobre higiene bucal (LÖE et al., 1986).

## **1.2 Osteoclastos e a reabsorção óssea**

O osso é um tecido estrutural dinâmico no qual as células sintetizadoras denominadas de osteoblastos produzem a matriz óssea, enquanto que os osteoclastos a reabsorve. Por isso, a densidade óssea depende da função relativa desses dois tipos de células (TOLAR et al., 2004).

As estruturas ósseas estão continuamente sendo remodeladas. Quando ocorre um desequilíbrio a favor do processo de reabsorção em detrimento do processo de neoformação óssea temos um excesso de atividade osteoclástica. A osteoclastogênese está aumentada em diversas doenças esqueléticas envolvendo a perda óssea generalizada ou localizada como a osteoporose, a doença periodontal, a artrite reumatóide, o mieloma múltiplo e as metástases ósseas. Um osteoclasto para exercer suas funções reabsortivas sofre diversas mudanças no seu citoesqueleto de actina para produzir uma firme adesão entre a superfície óssea e a sua membrana basal formando um “vacúolo externo” onde serão secretados os prótons  $H^+$  e enzimas líticas formando as lacunas de Howship (BOYLE et al., 2003).

A osteoclastogênese é um processo complexo e dependente de diversos fatores osteolíticos que atuam na diferenciação e ativação de osteoclastos por estimular a expressão do RANKL (ligante do receptor ativador de fator nuclear Kappa-B) por células do estroma da medula e osteoblastos como : PTH (hormônio paratireóideo), PTHrP (peptídeo relacionado ao PTH),  $PGE_2$  (prostaglandina E2), IL-1, IL-6, IL-11, IL-17,  $1-25(OH)_2D_3$  (1-25 diidroxicolecalciferol),  $TNF\alpha$ , corticosteróides, oncostatin M e LIF (fator inibidor de leucemia), além de várias outras cininas como: bradicinina, kalidina, trombina, e várias quimiocinas estimuladoras da reabsorção óssea (COCHRAN, 2008; UEDA et al.,1995). Outros mediadores atuam como inibidores de reabsorção óssea como: estrógenos, calcitonina, BMP 2 e 4 (proteínas ósseas morfogenética 2 e 4), TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador- beta), PDGF (fator

de crescimento derivado de plaquetas) o cálcio (KARTSOGIANNIS e NG, 2004; BOYLE et al., 2003). Estes mediadores são solúveis e podem ser detectados no soro e na saliva servindo de marcadores de atividade da doença periodontal ou podendo demonstrar remissão da mesma (FISHER et al., 2008; HERR et al., 2007; MARCACCINI et al., 2009).

A perda óssea alveolar é um achado comum associado à progressão da doença periodontal (AAP, 1999). O osteoclasto inicialmente solubiliza a fase mineral do osso acidificando o meio, o que leva a exposição da matriz de colágeno. Para isso, utiliza a enzima anidrase carbônica que converte o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em íon bicarbonato, que é secretado pela membrana basolateral, e o  $\text{H}^+$  que é bombeado pela vacuolar ATPase (V-ATPase) para o espaço tecidual subjacente ao tecido ósseo (INOUE et al., 1999). Sobre a matriz orgânica exposta, enzimas liberadas pelos osteoclastos, como metaloproteinases de matriz (colagenase e gelatinases) e catepsinas (B, D, L e N) degradam a fase orgânica do osso como o colágeno e proteoglicanos, gerando as lacunas de reabsorção (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

A descoberta do receptor ativador de fator nuclear Kappa-B, seu ligante, e da osteoprotegerina, (RANK/RANKL/OPG), produziu um grande avanço no entendimento da biologia óssea, principalmente do papel de pré-osteoblastos (células osteoprogenitoras) e células do estroma ósseo na osteoclastogênese. O RANKL é expresso na superfície de pré-osteoblastos, osteoblastos, células do estroma e do ligamento periodontal. Este se liga a receptores RANK na superfície dos precursores de osteoclastos, numa interação do tipo célula-célula. O Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF) também parece ser importante no contexto da osteoclastogênese, pois se liga a receptores c-Fms em células pré-osteoclásticas participando da sua diferenciação. Porém, é o RANKL a principal chave para a diferenciação, multinucleação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. A OPG, como o seu nome sugere, “protetor do osso”, é uma proteína da superfamília do receptor do TNF, participa como fator limitante do processo de osteoclastogênese, ligando-se ao RANKL solúvel, opondo-se a osteoclastogênese. Esse seqüestro de RANKL pela OPG limita a lise óssea, pois ambos são solúveis e essa interação inibe a osteoclastogênese. (SUDA et al., 1992; SIMONET et al., 1997; YASUDA et al., 1998; KHOSLA, 2001). Citocinas antiinflamatórias como a IL-

10 induzem o aumento da expressão de OPG e redução da expressão de RANKL, produzindo redução da reabsorção óssea (LIU et., 2006). A administração de OPG recombinante humana, administrada subcutâneamente em ratos submetidos a periodontite experimental por ligadura inibiu a perda óssea alveolar significativamente em relação ao controle, sugerindo sua participação como protetora de perda óssea alveolar induzida (JIN et al., 2007).

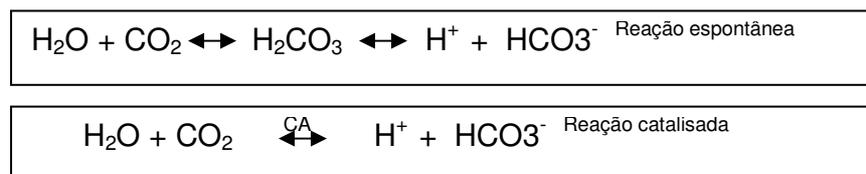
A osteoclastogênese também é dependente de fatores hormonais como o hormônio paratireoideano (PTH), este estimula a formação de osteoclastos por ligação a receptores nas células do estroma ósseo e nos osteoblastos estimula a formação do RANKL por um mecanismo dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e ativação da proteínaquinase A (PKA), bem como, inibindo a expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) da osteoprotegerina (OPG) (FU et al., 2002).

Os osteoclastos também podem ser regulados pelas células do ligamento periodontal e estas expressam RANKL sob situação de estresse mecânico como o que ocorre no movimento ortodôntico (OGASAWARA et al., 2004). Em cultura de células precursoras de osteoclastos a ação do RANKL e da IL-1 $\alpha$  mostrou-se capaz de induzir a expressão de anidrase carbônica tipo II, catepsina K e metaloproteinases de matriz-9, enzimas típicas de células osteoclásticas maduras (FUJISAKI et al., 2007).

### **1.3 A Anidrase Carbônica**

As primeiras evidências da existência das enzimas anidrases carbônicas (AC) foram encontradas em 1933. Ao Doutor Thomas Maren, que se dedicou por 50 anos de estudos, principalmente em peixes, se atribui as maiores contribuições no entendimento do papel fisiológico desta enzima, desde o local catalítico da mesma, sua participação no transporte iônico, na acidificação da urina, na regulação ácido-base, nas trocas gasosas e até na formação do líquido cérebro espinhal (SWENSON, 2003). Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, entre mamíferos ocorre o tipo alfa, em vegetais o tipo beta, e em procariontes o gama. A AC catalisa de modo reversível a hidratação e desidratação do CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, numa interconversão em bicarbonato e um H<sup>+</sup>. A atuação da mesma favorece

diferentes vias que não produzem o ácido carbônico, fato que ocorre espontaneamente sem a ação da AC. Inicialmente as AC's foram descobertas nos eritrócitos participando das trocas gasosas respiratórias. Trata-se de enzimas onde o local catalítico de atividade possui um átomo de zinco coordenado por três resíduos de histidina que produz uma vigorosa hidrólise da água gerando um próton ( $H^+$ ) e um radical ativo de Zn-OH (HENRY, SWENSON, 2000; TRIPP et al., 2004). (Figura 1)



**FIGURA 1.** Reação entre a  $H_2O$  e  $CO_2$  com e sem a presença da anidrase carbônica (Fonte: Henry, Swenson, 2000).

Atualmente são conhecidas 15 isoformas das anidrases carbônicas humanas, sendo 12 ativas cataliticamente as AC's I, II, III e IV, as AC's VA e VB, AC's VI e VII, AC IX e AC's XII, XIII e XIV (Di FIORE et al., 2009).

As isoenzimas da anidrase carbônica (AC) estão espalhadas no reino animal em diversas localizações como: no citossol (AC tipos I, II, III, VII e XIII) (ASARI et al., 1989; GAMBHIR et al., 2007, CARTA et al., 2009, Di FIORE et al., 2009); podendo ser secretadas por glandulas exócrinas (AC tipo VI) (NISHIMORI et al., 2007), ligadas a membrana plasmática (AC tipo IV e XIV) (TONG et al., 2000; WETZEL et al., 2007) como também de origem mitocondrial (AC tipo V) (HECK et al., 1996).

A atividade osteoclástica é dependente da AC tipo II e esta enzima, que também serve como marcador celular de diferenciação juntamente com, fosfatase ácida resistente ao tartarato, receptor vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$  integrina) e o receptor da calcitonina, é induzida pela atividade do fator de transcrição c-Fos/AP-1 em células progenitoras de osteoclastos (DAVID et al., 2001).

A expressão do RNAm da AC tipo II é dependente de estímulos como o PTH e a  $1,25(OH)_2D_3$ , reconhecidamente indutores de atividade osteoclástica, e de uma

interação física do tipo célula-célula das progenitores de osteoclastos e as células estromais da medula óssea (LOMRI, BARON, 1992; BISKOBING et al., 1997).

A calcitonina, um potente inibidor de reabsorção óssea, reduz de modo dose dependente a expressão do RNAm da AC tipo II em osteoclastos de ratos neonatais (ZHENG et al., 1994). Já o efeito poupador ósseo dos inibidores de ciclooxigenase-2 (COX-2) na artrite, como o celecoxibe, é em parte devido à inibição também da anidrase carbônica (KATAGIRI et al., 2006).

A osteoporose consiste basicamente numa redução da densidade mineral óssea geralmente avaliada numa localização femoral e lombar por aumento de reabsorção. Estudo com mulheres japonesas portadoras desta condição tem demonstrado um perfil polimórfico para os genes codificadores das enzimas anidrase carbônicas tipo 8 e 10, associando o polimorfismo TT dos respectivos genes com a menor densidade óssea (MORI et al., 2009).

A deficiência da anidrase carbônica tipo II foi identificada como o defeito primário na síndrome autossômica recessiva chamada osteopetrose. A osteopetrose é uma rara doença óssea metabólica caracterizada por aumento da massa óssea esquelética. Este defeito pode ser de origem intrínseca à linhagem dos osteoclastos ou células mesenquimais pré-osteoclásticas impedindo o desenvolvimento e maturação destas células. O prejuízo daí decorrente é motivado por uma incapacidade de reabsorção osteoclástica resultando na ausência de cavidades da medula óssea, atraso ou impedimento da erupção dental e formação de osso anormal, bem como acidose tubular renal e calcificação cerebral (FELIX et al., 1996; SCHWARTZ et al., 1991).

#### **1.4 Modulação da perda óssea alveolar e do processo inflamatório periodontal por medicações sistêmicas**

Independente da natureza dos fatores limitantes e restrições biológicas, a seqüência de tratamento para a maioria das doenças periodontais inflamatórias começa com o estabelecimento da boa higiene oral do paciente e o debridamento profissional dos dentes, isto é, raspagem e alisamento radicular (RAR) ou terapia não cirúrgica (COBB, 1996). Evidências consistentes suportam que essa terapia é componente

eficaz e efetivo no tratamento da doença periodontal da maioria da população, sendo considerada como terapia convencional (AXELSSON, LINDHE, 1981; WESTFELT *et al.*, 1983). Neste contexto, uma vasta literatura concernente à história natural da doença periodontal indica que poucos sítios ou um pequeno percentual de pacientes (8 a 12%) dentro de uma população pode se mostrar não-responsiva ao tratamento convencional (LAMSTER, 1992; CLAFFEY, EGELBERG, 1995).

Há situações em que a terapia convencional nem sempre alcança o resultado clínico desejado no tratamento da doença periodontal. Por exemplo, alguns pacientes possuem fatores de risco não-microbianos que são difíceis de reduzir ou eliminar como, tabagismo e diabetes ou estão além da capacidade do clínico em controlar, como por exemplo, os fatores genéticos. Nestes casos, e para grupos específicos de indivíduos suscetíveis a doença periodontal, o uso de terapias moduladoras do hospedeiro pode se justificar em conjunto com tratamentos convencionais de raspagem e alisamento radicular associado ao controle do biofilme dental (ORINGER- AAP, 2002).

A modulação da perda óssea alveolar por medicações sistêmicas envolve o conhecimento das vias de ativação da osteoclastogênese e dos seus alvos moleculares específicos, podendo atuar diretamente nos osteoclastos, nos seus precursores, nas células residentes ou migratórias do processo inflamatório periodontal. Salvi e Lang, (2005) revisando a literatura encontraram pelo menos seis alvos moleculares não antimicrobianos para a modulação da resposta do hospedeiro:

1- Tendo em vista a relevante destruição tecidual e óssea associada à periodontite, tem sido proposto o uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) como auxiliares à terapia periodontal com o objetivo de modular determinados metabólitos do ácido araquidônico. Dentre estes, as PGE<sub>2</sub> têm merecido destaque, sobretudo pela participação na ativação de osteoclastos em processos de reabsorção óssea periodontal (WILLIAMS *et al.*, 1996; MACNEIL *et al.*, 1996; AIRILA-MANSSON *et al.*, 2006).

Prostaglandinas, principalmente a PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub>, geradas a partir da ação das enzimas ciclooxigenases 1- e 2 sobre a cascata do ácido araquidônico tem se mostrado capazes de induzir reabsorção óssea em culturas de tecido. Os antiinflamatórios não-esteroidais como: flurbiprofeno, naproxeno e meclofenamato mostraram-se agentes capazes de produzir redução significativa da perda óssea radiograficamente em estudos clínicos envolvendo pacientes com doença periodontal (JEFFCOAT et al., 1991; REDDY et al., 1993; JEFFCOAT et al., 1995). Inibidores seletivos da ciclooxigenase-2, como o etoricoxibe e o celecoxibe também mostraram ser capazes de inibir a reabsorção óssea alveolar em estudos experimentais (HOLZHAUSEN et al., 2002, AZOUBEL et al., 2007).

2- Lipoxinas são mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico que possuem atividade antiinflamatória atuando como indutoras naturais da resolução do processo inflamatório. As lipoxinas A<sub>4</sub> e B<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub> e LXB<sub>4</sub>) e seus análogos possuem potente atividade antiinflamatória testadas em vários modelos animais, dentre estes, o modelo de periodontite induzida por ligadura. Estes mediadores atuam inibindo a migração de leucócitos induzida por *Porphyromonas gingivalis*. A aspirina possui uma atividade indutora da biossíntese de epímeros de lipoxinas denominados de aspirina induzida 15-epi-LX, que compartilha as ações antiinflamatórias das lipoxinas. Em animais transgênicos que superexpressavam a 15-lipoxina (15-LX), bem como a aplicação tópica de 15-epi-LXA<sub>4</sub> em animais não transgênicos reduziram a inflamação e a perda óssea alveolar induzida na doença periodontal (POULIOT et al., 2000; SERHAN, et al., 2003; SERHAN, 2005).

3- As metaloproteinases de matriz (MMP's) são enzimas zinco dependentes ligadas à membrana, sua principal função é catalisar a degradação de proteínas no plasma, membrana ou na matriz extracelular do tecido conjuntivo, sua ação também envolve a indução de reabsorção óssea (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). Níveis elevados do RNAm principalmente da MMP-3, mas também das MMP- 1 e MMP- 8 foram encontrados em tecidos gengivais inflamados (KUBOTA et al., 1996). MMP-3, MMP- 8 e MMP-9 dosadas no soro estão aumentadas em pacientes portadores de doença periodontal e as MMP-8 e a MMP-9 reduzem após terapia periodontal não invasiva (MARCACCINI et al., 2009). Doses subantimicrobianas de doxiciclina e tetraciclina modificadas tem demonstrado ser capazes de inibir a reabsorção óssea induzida em

modelos experimentais de periodontite (RAMAMURTHY et al., 2002; (BEZERRA et al., 2002). Recente estudo clínico piloto demonstrou que a doxiciclina em doses subantimicrobianas reduziu a profundidade de sondagem quando associado a tratamento cirúrgico na doença periodontal grave em relação ao placebo. (GAPSKI et al., 2004).

4- A IL-1 e o  $TNF\alpha$  constituem citocinas importantes indutores do processo inflamatório e da reabsorção óssea, atuam ativando as metaloproteinases de matriz, adesão de moléculas e a atividade osteoclástica. Níveis altos destas citocinas foram encontrados no fluido crevicular de pacientes com periodontite. O uso de antagonistas de IL-1 e TNF na periodontite experimental têm demonstrado uma relação de causa e efeito entre a atividade dessas citocinas e a propagação do processo inflamatório em áreas mais profundas do tecido conjuntivo. A administração intrapapilar desses antagonistas em macacos com periodontite induzida reduziu em 51% a perda de inserção do tecido conjuntivo e em 91% a perda de altura do osso alveolar, atuando também na formação de osteoclastos (GRAVES; COCHRAN, 2003; DELIMA et al., 2001). Inibidores do  $TNF\alpha$ , pentoxifilina e talidomida reduziram de modo dose dependente a perda óssea da periodontite induzida (de LIMA et al., 2004).

5- Existem três isoformas da óxido nítrico sintetase (NOS), isoenzimas que atuam tanto na produção fisiológica como na patofisiológica do óxido nítrico a partir da L-arginina em L-citrulina. Duas são dependentes de cálcio e atuam de modo constitutivo, a NOS endotelial (eNOS) a NOS neuronal (bNOS) e a terceira se comporta de modo independente de cálcio e é indutível (iNOS). Em linhagens celulares de macrófagos murinos o RNAm da iNOS está aumentado quando estimuladas por LPS (SOUTHAN, SZABÓ, 1996; CHESROWN et al., 1994). A marcação imunohistoquímica da iNOS nos tecidos periodontais afetados pela periodontite crônica foi intensa, reduzindo após terapia de raspagem e alisamento radicular (GÜLLÜ et al., 2005). Experimentalmente a inibição da perda óssea alveolar da periodontite foi significativamente menor com os inibidores da NOS, L-arginina metil ester (L-NAME) e aminoguanidina que o grupo que recebeu salina (LEITÃO et al., 2005).

6- Bifosfonatos são produtos estruturalmente similares aos pirofosfatos, moléculas com um arranjo tipo P-O-P que regulam a mineralização óssea por ligação aos cristais de hidroxiapatita e promoverem ação quelante sobre o cálcio. A substituição do oxigênio por átomo carbono (por exemplo, P-C-P) resulta na formação de um bisfosfonato, existem duas classes dessas drogas, nitrogenadas e não nitrogenadas. O efeito antireabsortivo dos bifosfonatos contendo nitrogênio na molécula, dentre eles, o alendronato, parece ser por inibição da enzima farnesil pirofosfato sintetase em osteoclastos, enzima fundamental para a ação osteoclástica (MENEZES et al., 2005; RUSSELL et al., 2008). O alendronato possui propriedades variadas como: antiinflamatória, antimicrobiana, inibidor de adesão à superfície óssea e citotóxicos para osteoclastos. Rocha et al., (2004) demonstraram que o alendronato reduziu a distância entre a junção cimento esmalte e a crista óssea alveolar em mulheres com doença periodontal estabelecida na pós-menopausa associado ao tratamento convencional mecânico. Os estudos clínicos de Lane et al., (2005) também demonstraram melhora nos índices periodontais de inserção clínica, profundidade de sondagem e índice de sangramento no grupo de pacientes que receberam alendronato e risendronato em relação ao controle com tratamento convencional.

Estudos experimentais demonstram inibição de reabsorção óssea alveolar em modelo de periodontite induzida por ligadura pelo alendronato (DUARTE et al., 2004; MENEZES et al., 2005).

Recentemente novos alvos moleculares têm surgido na modulação da doença periodontal, seja no processo inflamatório, seja na modulação da perda óssea. Estes estudos ainda estão em fase experimental, mas abrem novas perspectivas para futuros ensaios clínicos.

A limitação do estresse oxidativo produzido por PMN na periodontite, por exemplo, pode vir a se tornar um novo alvo molecular. A N-acetilcisteína, um tiol antioxidante, foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar de modo dose dependente em modelo de periodontite induzida por ligadura. A fisiopatologia da doença periodontal envolve indução de estresse oxidativo associado a espécies reativas de oxigênio produzidos pela ação de PMN. Estes produtos induzem danos celulares como peroxidação de lipídeos, inativação protéica, danos ao DNA e estimulação de vias de sinalização

indutoras de citocinas do processo inflamatório. As próprias espécies reativas de oxigênio produzem danos periodontais e estão associados com a reabsorção óssea (TOKER et al., 2009).

O bloqueio da expressão do RANKL, bem como inibição da diferenciação de células precursoras de osteoclastos na presença de RANKL foi induzido por rosiglitazona, um anti-hiperglicemiante oral, classificado como agonista sintético de alta afinidade pelo receptor ativado por proliferadores do peroxisoma (PPAR-gama). Esta droga inibiu a perda óssea alveolar em modelo de periodontite experimental por ligadura (HASSUMI et al., 2009).

### **1.5 A acetazolamida**

A acetazolamida é um derivado tiazídico potente inibidor não competitivo da anidrase carbônica, (ZHANG et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2003). Esta droga foi utilizada como diurético até ser substituída por agentes mais potentes. Por reduzir a produção do humor aquoso, clinicamente é utilizada no tratamento do glaucoma além de outras utilizações que incluem a epilepsia e o mal das montanhas (RANG et al., 2003).

Como diurético, a acetazolamida inibe a reabsorção de sódio através da inibição da anidrase carbônico tipo II citoplasmática e a tipo IV luminal do túbulo proximal resultando de uma maior excreção de bicarbonato,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e água nos segmentos mais distais do néfron aumentando a diurese (BHATTACHARYA e ALPER, 2009).

A partir de 1970, a acetazolamida foi associada à regulação do metabolismo ósseo e no controle da calcemia, embora estudos envolvendo o tratamento de mulheres pós-menopausadas por 28 dias não tenham produzido efeitos sobre a reabsorção óssea (GREENE; KENNY, 1992).

A acetazolamida é solúvel em propilenoglicol e lipídios e atravessa facilmente a membrana celular (LOPES, MARTINELLI, 2010).

Em ratos após injeção intraperitoneal a acetazolamida alcança um pico plasmático após 1h de administração e após 2 h não é detectada no sangue (SONE et al., 1998).

Em humanos a acetazolamida tem uma duração aproximada de 8 a 12 horas com tabletes de liberação imediata e 18 a 24 horas quando a formulação é de liberação lenta. A taxa de ligação com as proteínas plasmáticas é de 90 a 95%. O volume aparente de distribuição para concentração total é de 0,2 L/Kg. A sua farmacocinética segue o modelo de dois compartimentos com uma meia vida alfa de 1,6 horas e meia vida beta ou de eliminação de 10 a 12 horas. Até 80 % da droga é excretada por secreção tubular renal (REISS; OLES, 1996).

Os osteoclastos maduros expressam anidrase carbônica tipo II que é crucial na geração de prótons promovendo a lacuna de reabsorção. Essa produção pode ser inibida pela acetazolamida (LEHENKARI, et al., 1998).

Foi demonstrado que a acetazolamida além de inibir a produção de prótons para acidificação do meio também inibiu a secreção da procathepsina L responsável pela digestão da matriz orgânica do tecido ósseo (OHBA et al., 1996). A acetazolamida inibiu a reabsorção radicular em dentes avulsionados por até 60 dias após o reimplante (MORI et al., 2006).

Novas atividades tem sido relatadas para esta antiga droga como inibidora de angiogênese e de proliferação de células endoteliais em modelo de câncer pulmonar de Lewis (XIANG et al., 2004). Felipe Junior (2008), em trabalho de revisão, encontrou diversas atividades anticâncer da acetazolamida como: Inibidor de crescimento tumoral, capaz de aumentar a apoptose, inibidora de neoangiogênese e ainda capaz de diminuir a invasão tumoral e as metástases.

## **1.6 Biomarcadores**

Os métodos atualmente utilizados falham no diagnóstico precoce da doença periodontal ou em prever pacientes de risco em desenvolvê-la. Apesar de um biomarcador específico para a DP ainda não ter sido identificado, as combinações de possíveis biomarcadores estão em sendo avaliados no fluido crevicular e tem

demonstrado um potencial significativo como alvo para o desenvolvimento de uma impressão digital do status da DP. Biomarcadores específicos como as metaloproteinases de matriz (MMP) -8, IL-1 $\beta$ , IL-6 e um telopeptídeo de colágeno tipo I (ICTP) tem sido utilizado como identificador da doença (RAMSEIER et al., 2009).

Sistemas miniaturizados para dosagem rápida salivar de MMP-8 tem sido utilizado com sucesso no diagnóstico da DP com uma vantagem de ser um método não invasivo e com potencialidade de uso doméstico. A MMP-8 tem sido associada como uma das principais enzimas de destruição tecidual do periodonto na DP (HERR et al., 2006).

A níveis séricos ou plasmáticos de IL-6 e a proteína C-reativa que se encontravam altas em pacientes com DP em relação aos controles, reduzem após três meses de tratamento não cirúrgico, demonstrando uma relação de causa e efeito entre a infecção e o seu tratamento (MARCACCINI et al., 2009).

Além da utilidade no diagnóstico, os biomarcadores, sejam séricos, plasmáticos, do fluido crevicular ou salivar, podem ajudar no entendimento da fisiopatologia da DP na resposta do hospedeiro. A utilização da tecnologia dos microarranjos de DNA ou de proteínas (microarrays) pode muito colaborar com a identificação e novos alvos e proporcionar um controle mais eficaz das doenças bucais (NAZMUL-HOSSAIN et al., 2008).

## 2.0 JUSTIFICATIVA

Considerando que a doença periodontal está amplamente distribuída na população, representando a principal causa de perda de dentes em adultos, e que o tratamento convencional ainda não controla a progressão da perda óssea em 100% dos pacientes.

Considerando que um fármaco que venha a ser utilizado para modulação da resposta do hospedeiro deve prever a sua utilização por um período moderado a prolongado.

Considerando que é necessário estudos de segurança para futuros estudos clínicos.

Justifica-se a investigação da acetazolamida, um fármaco utilizado em doenças crônicas como glaucoma, em ratos com periodontite experimental em um estudo de eficácia e segurança.

---

**OBJETIVOS**

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

- avaliar a eficácia e segurança da acetazolamida na periodontite experimental em ratos

#### **3.2 Específicos:**

- Avaliar a ação protetora da acetazolamida contra a reabsorção óssea induzida por periodontite experimental
- investigar marcadores séricos de atividade da doença periodontal e a influência da acetazolamida nesse processo
- avaliar histologicamente o periodonto sob influência da periodontite e da acetazolamida
- avaliar o perfil de segurança da acetazolamida por análise de órgãos, hemograma e dosagens de Transaminase glutâmico oxalacética (TGO), Transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e gama glutamil transferase (gama GT).

---

**MATERIAIS E MÉTODOS**

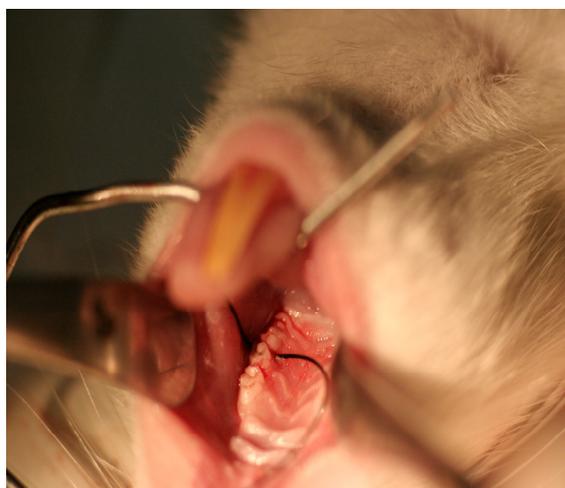
## 4.0 MATERIAIS e MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 85 (oitenta e cinco) ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, machos, massa de 200 e 250 gramas. Todos receberam ração comercial balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação, ciclo de 12 horas claro escuro, temperatura e umidade controlada. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas legais de bem estar dos animais e o protocolo experimental foi aprovado sob número 05/2007 pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública do estado da Bahia.

### 4.2 Modelo de Periodontite Experimental

Foi utilizado o modelo de periodontite experimental por ligadura (de LIMA et al., 2000, 2004), o qual consiste em inserir, cirurgicamente, um fio de sutura de náilon 000, em torno do segundo molar superior esquerdo de um rato anestesiado com Hidrato de cloral a 10% (250 mg/kg), via intraperitoneal (IP). Previamente à passagem do fio, uma guia foi utilizada nos espaços interproximais mesial e distal do dente citado. Logo em seguida, o fio foi passado, de forma que o nó cirúrgico fosse voltado para a face vestibular dos dentes (Figura 2). O lado contralateral direito da maxila foi utilizado como controle no próprio animal. Os animais foram pesados diariamente.

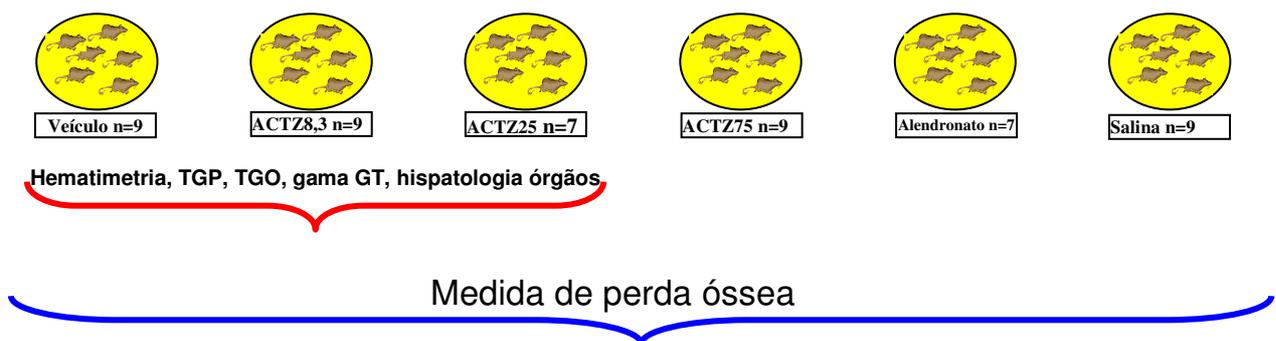


**FIGURA 2.** Cirurgia de ligadura em maxila de rato com fio de nylon 000 sendo passado entre o segundo e terceiro molares esquerdos para indução de periodontite.

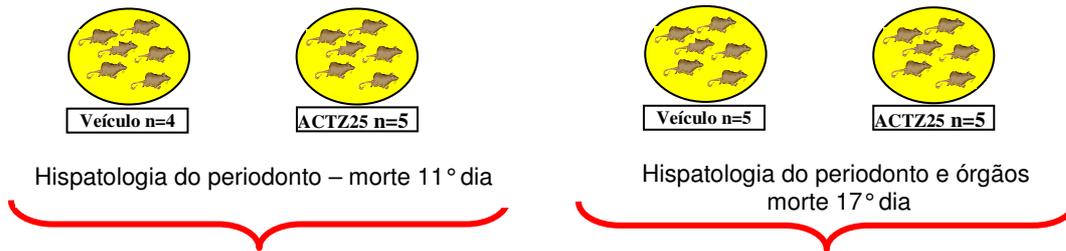
### 4.3 Fármacos e tratamentos

O desenho do estudo envolveu a divisão dos animais em grupos sendo realizados em três momentos diferentes: análise de perda óssea alveolar com 6 grupos totalizando 50 animais com morte no 11° dia, dosagem de biomarcadores séricos em 3 grupos totalizando 15 animais com morte no 11° dia e estudo histopatológico do periodonto, 4 grupos, sendo 2 grupos com morte no 11° dia e 2 grupos com morte no 17° dia totalizando 20 animais. Abaixo está discriminado o regime e as doses utilizadas em cada grupo.

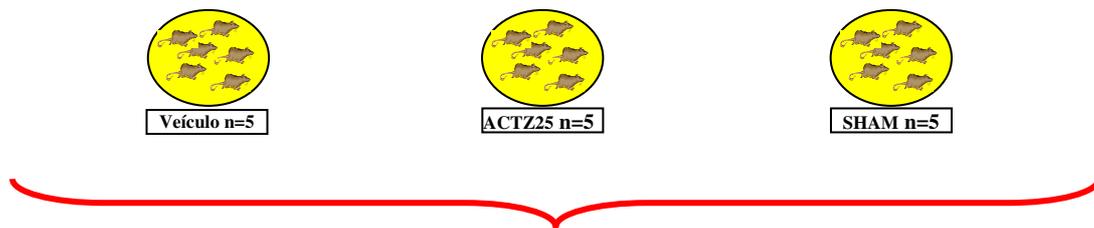
As análises de perda óssea foram feitas com 6 grupos de animais, que receberam respectivamente: - Veículo (propilenoglicol) 0,4mL/100g (n=9), Acetazolamida (ACTZ) (Deg Imp. de Produtos Químicos Ltda, São Paulo, SP, lote: 20060610#2) nas seguintes doses: 8,3 mg/Kg (n=9), 25mg/Kg (n=7) e 75mg/Kg (n=9) intraperitonealmente (IP) divididos em duas vezes ao dia (BID). Os três primeiros grupos também realizaram exames de hematimetria, dosagens de TGP, TGO e gama GT e histopatologia de órgãos (Figura 3). Também um grupo controle positivo com alendronato sódico 0,08 mg/Kg (n=7) (Pharma Nostra, Méier, Rio de Janeiro, lote: 06112256c) e um grupo com salina (n=9) IP uma vez ao dia foi utilizado. Posteriormente, para as dosagens de citocinas por microarray, foram utilizados 3 grupos: ACTZ 25/mg/Kg/IP, duas vezes ao dia (BID) (n=5), Veículo 0,4mL/100g (n=5) IP, BID e um grupo com cirurgia de indução simulada (SHAM) (n=5) (Figura 5). Análise histológica do periodonto com ocorreu em 4 grupos com morte 11 e 17 dias (n=5) e receberam ACTZ 25 mg/Kg ou veículo (Figura 4). A acetazolamida foi diluída em propilenoglicol (veículo) (Gerbras, Química Farmacêutica Ltda, Diadema, São Paulo, lote: Q02234) .



**Figura 3.** Desenho do estudo de medida de perda óssea análise de segurança em ratos



**FIGURA 4.** Desenho do estudo da histopatologia do periodonto em dois momentos.

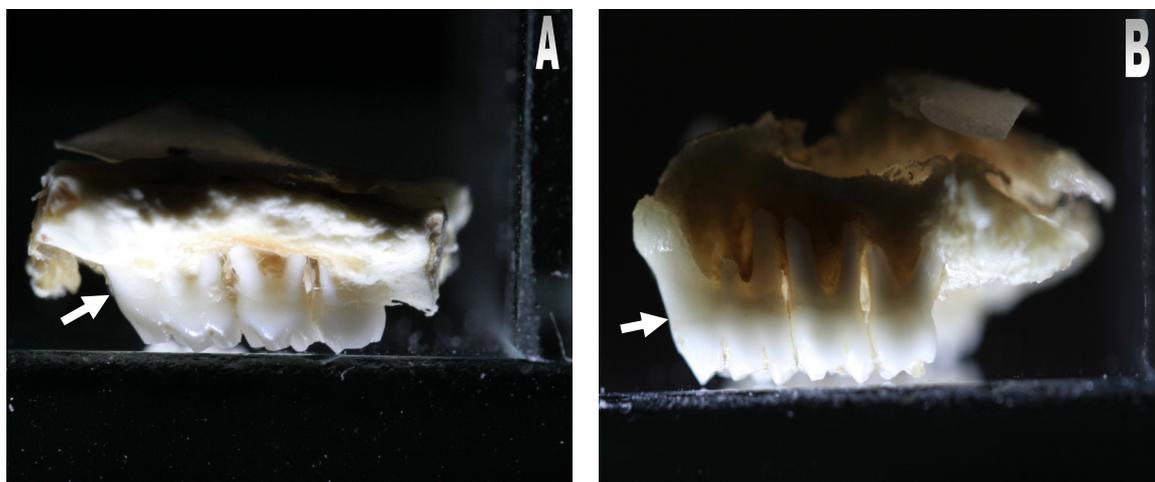


**FIGURA 5.** Desenho do estudo da dosagem de biomarcadores séricos

#### 4.4 Medida da perda óssea alveolar

Seis grupos de animais foram utilizados, no 11º dia após o procedimento cirúrgico, os animais foram mortos e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. A seguir, as maxilas foram dissecadas mecânica e quimicamente com NaOH a 0,2 %, por 10 minutos. A área de raiz exposta foi avaliada pelo método descrito por Kuhr *et al.*, 2004 com uma adaptação para identificar a junção cimento esmalte (JCE) até a margem do osso alveolar dos molares envolvidos. Foi utilizada a transiluminação da maxila para evidenciar a JCE (Figura 6), onde as maxilas eram colocadas sempre com a oclusal para baixo em um suporte de vidro que permitia uma padronização tridimensional no espaço. Um foco de luz incidia de baixo para cima destacando a JCE. Fotografias digitais foram obtidas, tanto no lado com a doença induzida como no contralateral, por meio de uma máquina Canon EOS Rebel XT equipada com uma lente Canon 60mm f/2.8 (Canon inc, Taiwan). Estas foram padronizadas para a distância focal, posição espacial das maxilas e regulagem da máquina em abertura e velocidade do obturador. Um avaliador cego e calibrado estimou a perda óssea, em milímetros, por meio da área de exposição de raiz (Figura 7), subtraindo-se o lado contra-lateral direito (controle) com o esquerdo. Para essa finalidade o programa Motic Images® 3.0 (Motic, Causeway Bay, Hong

Kong) foi utilizado. As medidas foram calibradas no programa de acordo com as instruções do fabricante.



**FIGURA 6.** Fotografia de maxilas dissecadas mecânica e quimicamente de ratos com doença periodontal transluminadas para destacar a JCE (seta branca). Foto A representativa do grupo ACTZ75. Foto B representativa do grupo veículo.



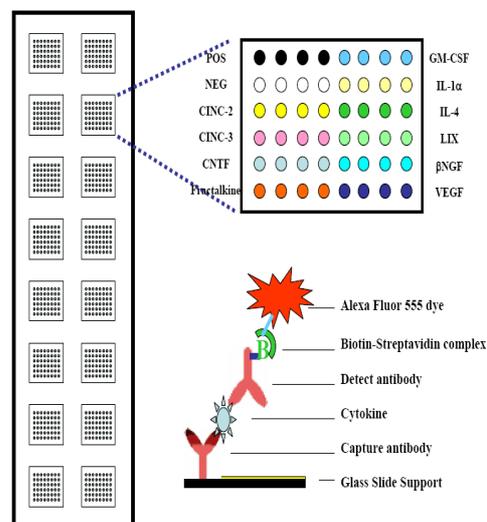
**FIGURA 7.** Fotografia de maxila de rato com medida da área de exposição de raiz em mm<sup>2</sup> pelo programa Motic Images® 3.0

#### 4.5 Dosagens de biomarcadores inflamatórios séricos por microarray de proteínas

Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (250 mg/kg), via IP, uma amostra de sangue de 1,2 mL foi colhida do plexo ocular em tubos de ensaio estéreis, antes da indução da doença periodontal e no dia da morte dos animais. Estas foram centrifugados a 3500 rpm por 10 min, o soro foi retirado, acondicionado em criotubos de 1,2 mL, fabricado em polipropileno livre de desoxirribonuclease (DNase), ribonuclease (RNase), pirogênios e toxinas (TPP AG, Trasadingen, Suíça)

e armazenados em nitrogênio líquido até as análises. O soro original foi diluído em 1:10 em água bidestilada e amostras de 100  $\mu$ L foram utilizadas para a técnica de dosagem dos mediadores por Microarranjos (Microarray). Um kit Quantibody™ Rat Cytokine Array 1 (Raybiotech, Inc, Norcross, Georgia, EUA) foi utilizado. Os seguintes mediadores foram dosados: interleucinas-1 $\alpha$  e -4 (IL-1 $\alpha$  e IL-4), fractalkine (CX3CL1), citocina quimiotática indutora de neutrófilos 2 e 3 (CINC-2 e CINC-3), quimiocina induzida por LPS (CXCL5) (LIX), fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), fator de crescimento neuronal beta ( $\beta$ NGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator neurotrófico ciliar (CNTF). A leitura foi realizada em um scanner a laser Axon GenePix 4100A (Molecular Devices, Downingtown, Pensilvânia, EUA). Os parâmetros de avaliação foram: Excitação: 555 nm, emissão: 565 nm; Resolução: 10  $\mu$ m. Para análise quantitativa dos dados, foi utilizado o programa RayBio Q Analyzer® (Raybiotech, Inc, Norcross, Georgia, EUA).

A dosagem de citocinas por Microarray segue um padrão semelhante ao ELISA em um chip de vidro que permite determinação da concentração de 10 citocinas simultaneamente (Figura 8). Neste kit está uma lâmina de vidro na qual 16 arranjos ordenados de anticorpos foram colocados com o uso de um dispositivo sem contato direto. Um suporte desenhado com 16 poços (Figura 9) foi integrado à lâmina para delimitar a região dos poços e guiar a deposição das amostras.

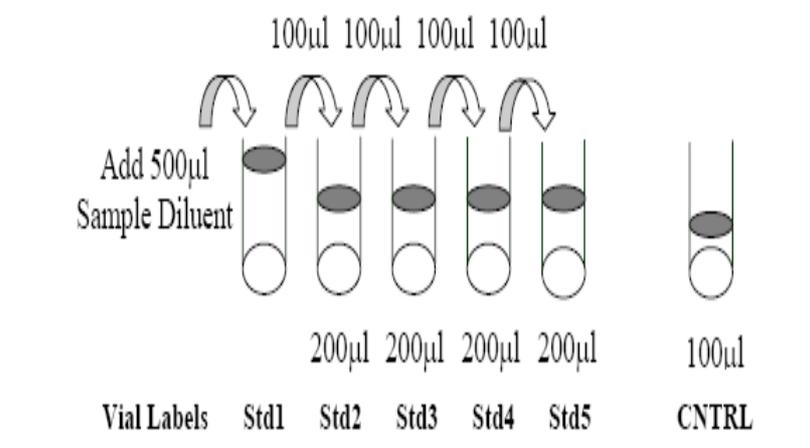


**FIGURA 8.** Desenho esquemático mostrando estrutura de detecção de citocinas posicionadas em quadruplicata e seqüência de ordenação de anticorpos do microarray de proteínas.



**FIGURA 9.** Chip de vidro delimitado por um suporte plástico formando 16 poços para dosagem de citocinas por microarray.

Cada um dos 10 anticorpos específicos para capturar as citocinas é disposto em quatro pontos do chip delimitado pelo poço, ou seja, a determinação é feita em quadruplicata, junto com os controles de positivo e negativo. Os seis primeiros poços servem para a construção da curva padrão de quantificação das absorbâncias de emissão do flúor Alexa Flúor 555. Para tanto, uma mistura padrão de citocinas fornecida no Kit é adicionada a 500  $\mu\text{L}$  de diluente e homogeneizado. Pipeta-se 100  $\mu\text{L}$  do padrão e adiciona-se a tubo seguinte com 200  $\mu\text{L}$  de diluente e assim por diante mais três vezes. Em um tubo coloca-se 100  $\mu\text{L}$  apenas com o diluente, “controle negativo” Amostras de 100  $\mu\text{L}$  de cada padrão foi adicionada aos seis primeiros poços para formar a curva padrão (Figura 10).



**FIGURA 10.** Diluições seriadas do padrão de citocinas para construção da curva padrão.

#### **4.5.1 Procedimentos de bloqueio e incubação**

Foi adicionado 100µl do diluente de amostras dentro de cada poço e incubado à temperatura ambiente por 30 min para paralisar a atividade das lâminas, posteriormente remove-se a solução tampão de cada poço por pipetagem e despreza-se. Em seguida adiciona-se 100µl de citocinas padrões e amostras a cada poço e incubam-se as amostras à temperatura ambiente por 1 hora.

Após esse procedimento foi decantado as amostras de cada poço e lavado 5 vezes com 200 µL da solução tampão I e depois 2 vezes com 200 µL da solução tampão II à temperatura ambiente com uma agitação suave.

O anticorpo de detecção foi adicionando a 1.4 mL do diluente de amostra ao tubo e homogeneizado. Uma amostra de 80 µL deste foi incubada em cada poço à temperatura ambiente por 1 hora, e repetida as lavagens anteriormente descritas.

O passo seguinte é a incubação por 1 hora com o Alexa Flúor 555 conjugado com Streptavidina, anteriormente diluído com 1,4 mL do diluente e homogeneizado, este passo deve ser protegido da luz envolvendo-se a lâmina com papel alumínio. Após este tempo lava-se 4 vezes com a solução tampão I.

#### **4.5.2 Preparação da lâmina para detecção da fluorescência**

O suporte plástico que individualiza os poços é removido restando apenas uma lâmina de vidro que é colocado em um tubo de centrifuga de 50 mL e adiciona-se 40 mL da solução tampão I. Em um agitador orbital a lâmina é lavada suavemente por 15 minutos e posteriormente com a solução tampão II por 5 minutos a temperatura ambiente.

Após a remoção desta solução as lâminas são centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos para secagem e encaminhadas para a leitura em um scanner a laser Axon Gene Pix. Dados brutos são gerados e posteriormente transferidos para uma planilha RayBio Q Analyzer® (Raybiotech, Inc, Norcross, Georgia, EUA), onde os valores são quantificados.

#### **4.6 Análise histológica do periodonto**

Os animais foram mortos por deslocamento cervical após anestesia com hidrato de cloral a 10% IP. As hemiarcadas foram removidas e fixadas em formol 4% tamponado por 24 horas. A seguir, foram submetidas a tratamento com EDTA a 10%, por até 20 dias, para a desmineralização. As hemi-maxilas, direita e esquerda (com doença) foram desidratadas e incluídas em parafina de modo que os cortes mostrassem a área entre os molares. Após a inclusão, cortes seriados de 5µm foram feitos em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas pelo método HE. A leitura foi realizada através de microscópio ótico com aumento de 100X para quantificação do infiltrado e avaliação do periodonto e 400X a diferenciação celular. Através de microscopia ótica, o infiltrado inflamatório foi graduado em escores: (0) ausência de infiltrado celular ou restrito à região da gengiva marginal, (1) leve infiltrado celular, (2) moderado infiltrado celular e (3) intensa infiltração celular. Quanto ao estado de preservação do osso alveolar e cimento os escores foram: (0) processo alveolar e cimento preservados (1) leve reabsorção do processo alveolar e cimento, (2) extensa reabsorção do processo alveolar com reabsorção parcial de cimento, (3) reabsorção total do processo alveolar e cimento (MENEZES et al., 2005).

#### **4.7 Análise dos parâmetros sistêmicos (ou do Perfil de segurança)**

##### **4.7.1 Estudo bioquímico e hematimetria**

Foram utilizados os mesmos animais para a medida de perda óssea, os grupos que receberam acetazolamida nas doses de 8,3 mg/Kg e 25 mg/Kg, bem como o veículo. A coleta foi realizada 7 dias antes da indução da doença e no dia da morte. A anestesia foi a mesma de todos os procedimentos. Foram coletados 0,6 mL de sangue e acondicionado em microtubos de ensaios com EDTA (Mini Collect, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Áustria) para a hematimetria pelo método Eletrônico em aparelho Cell Dyn 3000 (Abbott Lab. Illinois, EUA) e 1,0 ml em tubos de PVC

estéreis para obtenção do soro visando às dosagens de enzimas hepáticas como: - TGP (ALT), TGO (AST), bem como da gama GT.

#### **4.7.2 Análise histológica de órgãos**

Segmentos de fígado, baço, coração, rins e pulmão foram removidos, fixados em formol 10% por 24 horas. Posteriormente foram incluídos em parafina e dois cortes de 5µm de cada órgão foram realizados e corados com hematoxilina e eosina, sendo então analisados sob microscopia óptica com aumento de 100X, enquanto o coração foi utilizado o aumento de 400X. Estas análises ocorreram nos grupos com morte prevista para o 11º dia e no grupo que se estendeu até o 17º dia com a dose de 25 mg/Kg respectivamente de acetazolamida e seu veículo.

#### **4.8 Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram, inicialmente, analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana e intervalo interquartil (dados não paramétricos). Comparações entre três ou mais grupos de tratamento em cada fase do estudo (intergrupos) foram realizadas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey (para verificar diferenças entre os grupos aos pares) ou de Dunnett (para verificar diferenças entre os grupos tratados e o controle) (dados paramétricos), ou do teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas). Comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste *t* para dados não emparelhados (variáveis paramétricas) ou pelo teste de Mann-Whitney. Comparações entre as fases de pré e pós-tratamento num mesmo grupo (intragrupo) foram realizadas pelo teste *t* para

dados emparelhados (dados paramétricos) ou pelo teste de Wilcoxon (não paramétricos). O *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.00 para Windows<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos, exceto para a aplicação do teste de Mann Whitney na avaliação histológica onde foi utilizado o SPSS versão 13 (IBM Company Headquarters, Chicago, Illinois, U.S.A.).

Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade  $\alpha$  do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor  $p$  menor que 0,05.



## 5.0 RESULTADOS

Os resultados serão mostrados em gráficos, tabelas, e de forma descritiva.

### 5.1 Medidas da perda óssea alveolar

As medidas da perda óssea alveolar estão descritas em termos de área de raiz exposta e os resultados estão mostrados em milímetros quadrados. Acetazolamida injetada uma hora antes da indução da periodontite e por 11 dias protegeu o processo alveolar da reabsorção induzida pela periodontite experimental nas doses de 25 e 75 mg/Kg em relação ao veículo (propilenoglicol) (\* $p < 0,05$ ). Estas comparações entre os quatro grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações de Dunnett, para verificar diferenças entre o grupo veículo e os demais (Figura 11). Este resultado demonstra uma participação da anidrase carbônica na reabsorção óssea induzida da periodontite. As doses estudadas representam evidências de grande afinidade da acetazolamida com osteoclastos do periodonto.

O alendronato, controle positivo, também protegeu o periodonto em relação à salina ( $p < 0,05$ ) (Figura 13). O teste  $t$  para dados não emparelhados foi usado para comparar os dois grupos. Constatou-se que a área de reabsorção óssea mensurada no grupo alendronato foi significativamente menor (\*\* $p = 0,0029$ ) que a verificada no grupo Controle. Não foi encontrada diferença estatística em relação aos dois controles negativos (veículo e salina entre si, ( $p = 0,4247$ )) (Figura 14) bem como, entre o alendronato e as 3 doses de acetazolamida, (Figura 12) embora a dose de 8,3 mg/Kg não tenha tido diferença estatisticamente significante do veículo ( $p > 0,05$ ). Comparações entre os quatro grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações de Dunnett. Não foram constatadas diferenças estatisticamente (ANOVA:  $F = 1,7376$ ;  $P = 0,1821$ ).). A dose de 75mg/kg da acetazolamida apresentou uma eficácia na redução da reabsorção óssea chegando a 47,23%, enquanto o alendronato chegou a 54,82 % de eficácia na redução, esses dados representam as duas maiores eficácia na proteção antireabsortiva (Figura 15). Os dados estão mostrados nos gráficos e tabela 1 abaixo.

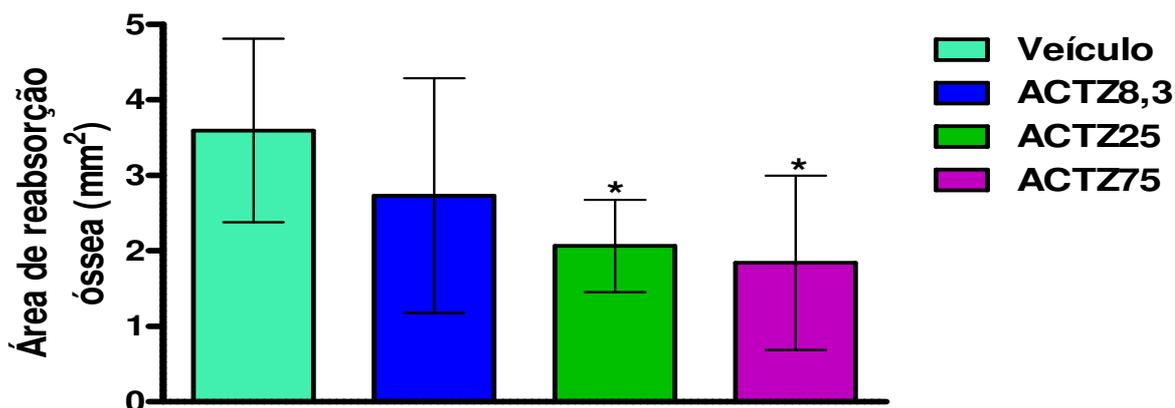


FIGURA 11. Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Veículo, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo ACTZ25 e 9 ratos dos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ75 (\* $p < 0,05$ ).

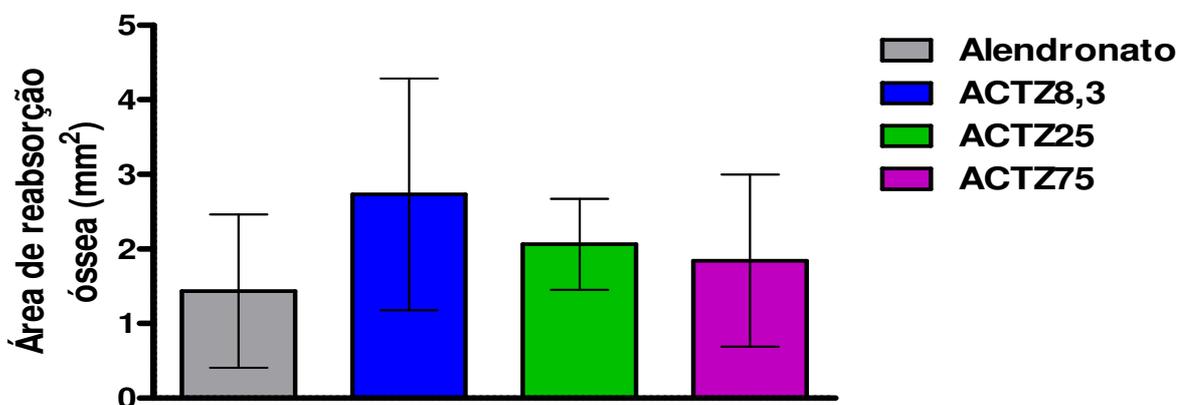


FIGURA 12. Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Alendronato, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais dos grupos Alendronato e ACTZ25 e 9 ratos dos grupos ACTZ8,3 e ACTZ75 ( $p > 0,05$ ).

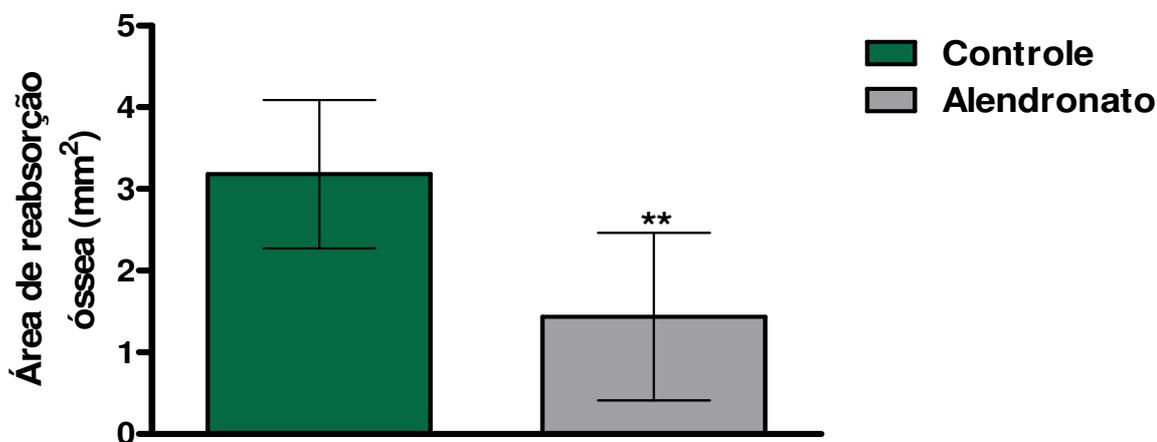


FIGURA 13. Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Controle e Alendronato. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 9 animais do grupo Controle e 7 ratos do grupo Alendronato (\*\* $p < 0,05$ ).

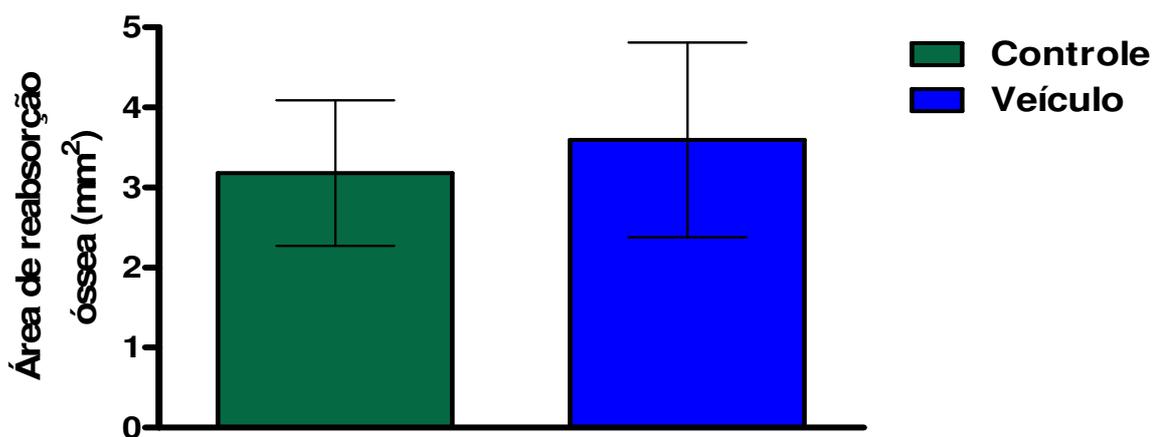


FIGURA 14. Área de reabsorção óssea mensurada nos grupos Controle e Veículo. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 9 animais de cada grupo ( $p > 0,05$ ).

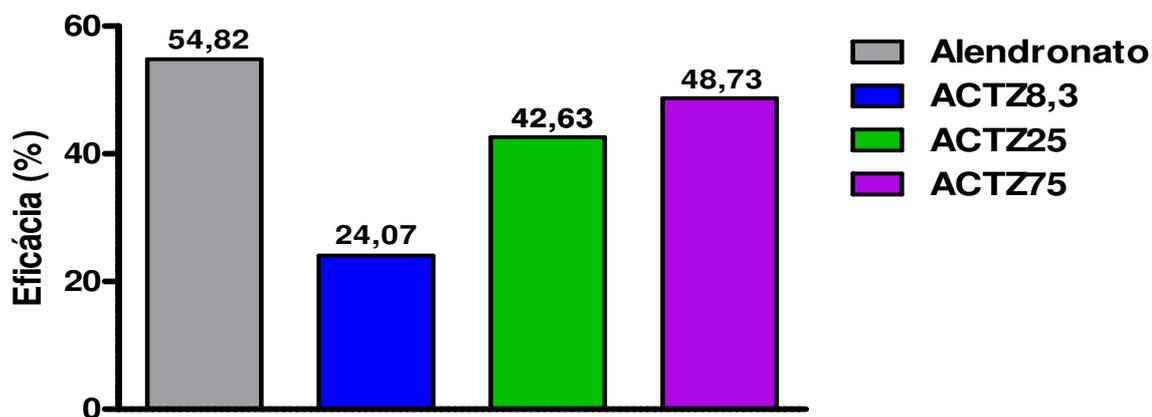


FIGURA 15. Avaliação da eficácia dos tratamentos com Alendronato, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75, expressão em termos percentuais, definida como o percentual de redução da área média de reabsorção óssea (ARO) dos seus respectivos controles, conforme a seguinte expressão:

$$Eficácia(\%) = \frac{ARO(\text{controle}) - ARO(\text{fármaco})}{ARO(\text{controle})} \cdot 100, \text{ onde ARO corresponde à área média}$$

de reabsorção óssea e controle diz respeito aos grupos Controle (Alendronato) ou Veículo (ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75).

**TABELA 1.** Valores da média e desvio padrão da área de reabsorção óssea referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Controle, Veículo, Alendronato, ACTZ8,3, ACTZ25 e ACTZ75.

Grupo	n	Média	Desvio padrão
Controle	9	3,18	0,91
Veículo	9	3,60	1,22
Alendronato	7	1,44	1,03
ACTZ8,3	9	2,73	1,55
ACTZ25	7	2,06	0,61
ACTZ75	9	1,84	1,15

## 5.2 Análise histológica do periodonto

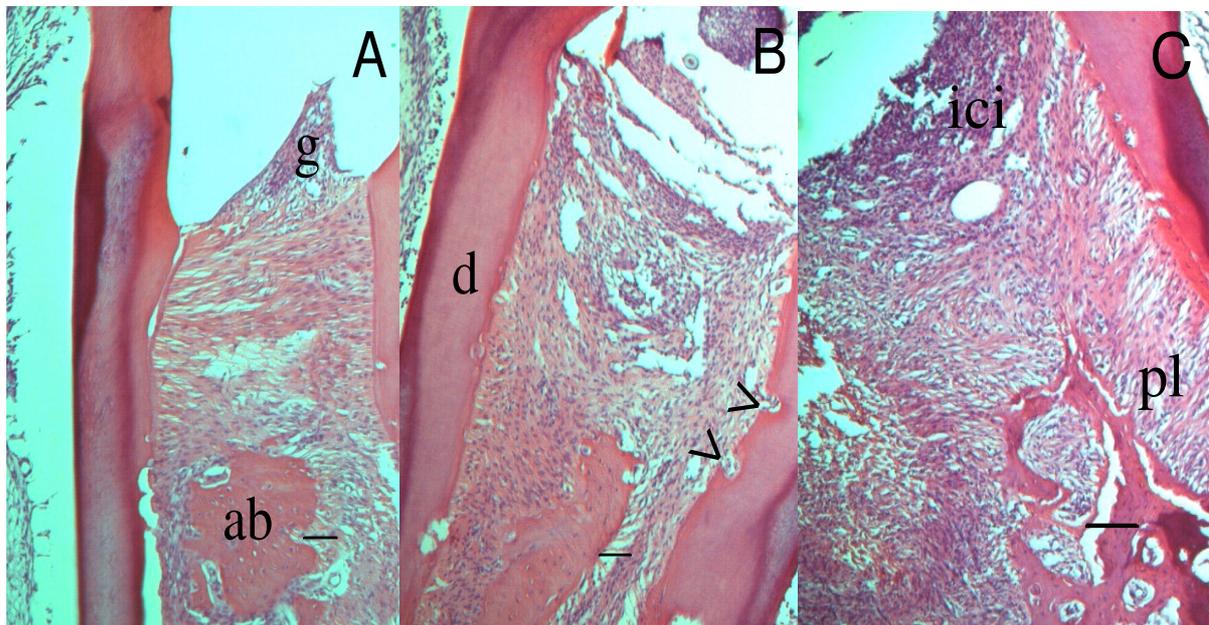
A análise histológica abrangeu a região proximal em volta do segundo molar superior esquerdo quanto ao infiltrado inflamatório e a preservação do processo alveolar e do cimento, enquanto que o lado direito da maxila foi utilizado com padrão de normalidade (Tabela 2). Os animais sacrificados no 11º dia apresentavam infiltrado celular inflamatório leve, mediana escore 1(1-2) para o veículo, enquanto o grupo ACTZ25 o infiltrado obteve uma mediana maior, porém sem diferença estatisticamente significativa, mediana de escore 2 (2-2,5) (Figura 16). Este ainda mostrava uma melhor reorganização do colágeno em relação ao controle e um infiltrado tipicamente crônico mostrando características de reparo. Quando os animais foram mortos no 17º dia à análise do infiltrado no grupo ACTZ25 e no veículo foi ausente escore em 0, provavelmente por superficialização do fio e afastamento do fator irritante (Figura 17). A análise do estado de preservação do processo alveolar e cimento no estudo com duração de 11 dias demonstrou que o grupo veículo obteve uma mediana maior que o ACTZ25, porém sem diferença estatisticamente significativa. Com a evolução do estudo para 17 dias o grupo ACTZ25 demonstrou uma melhor preservação do processo

alveolar, com menos áreas de reabsorção óssea e cementária, com uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,048$ ).

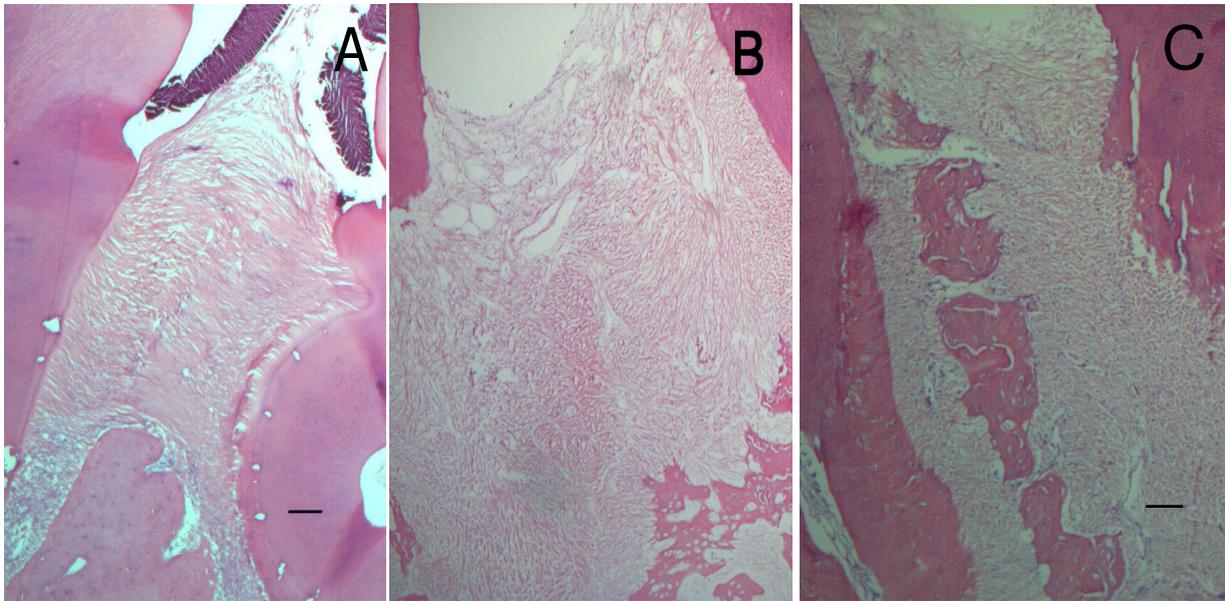
**TABELA 2.** Análise histológica do periodonto de ratos com periodontite. Mediana e intervalo interquartil dos escores do infiltrado inflamatório e da preservação do periodonto.

Quantificação do infiltrado inflamatório				
Duração	Estudo 11 dias		Estudo 17 dias	
Grupos	Veículo	ACTZ25	Veículo	ACTZ25
Escore	1 (1-2)	2 (2-2,5)	0 (0-0)	0 (0-0)
Preservação do periodonto				
Duração	Estudo 11 dias		Estudo 17 dias	
Grupos	Veículo	ACTZ25	Veículo	ACTZ25
Escore	2 (1,25-2)	1 (1-2)	2 (1,5-2)	1 (1-1)*

\* $p<0,05$  comparando grupo veículo- ACTZ25 (Mann-Whitney)



**FIGURA 16.** **A** Fotomicrografia representativa de periodonto de rato sem doença. **B**, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam veículo mostrando zonas de reabsorção do cimento (setas pretas). **C**, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam ACTZ 25mg/Kg mostrando infiltrado inflamatório moderado e parcial preservação do processo alveolar e cimento. Estudo de 11 dias. (g= gengiva, ab= osso alveolar, d= dentina, pl= ligamento periodontal, ici= infiltrado inflamatório, H&E; aumento original 100X, Barra =300 $\mu$ m)



**FIGURA 17.** **A** Fotomicrografia representativa de periodonto de rato sem doença. **B**, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam veículo mostrando ausência de infiltrado e total reabsorção do processo alveolar e moderada reabsorção do cimento **C**, Fotomicrografia representativa de periodonto de ratos que receberam ACTZ 25mg/Kg mostrando ausência de infiltrando inflamatório e parcial preservação do periodonto. Estudo de 17 dias. (H&E; aumento original 100X, Barra =300 $\mu$ m).

### 5.3 Dosagem de biomarcadores séricos por microarray

Os valores dosados foram obtidos por interpolação nas curvas padrões geradas por concentrações conhecidas dos biomarcadores. Foram escolhidos os dados gerados pelo modelo de regressão linear. Os dados brutos foram corrigidos em função da diluição de 1:10 do soro original.

A tecnologia de dosagens dos biomarcadores mostrou-se bastante sensível, principalmente em relação a IL-4 que freqüentemente era causa de insucesso de quantificação pelo método tradicional de ensaio imuno-absorvente ligado à enzima (ELISA).

Os resultados estão apresentados em tabelas de acordo com a distribuição, dados não paramétricos (Tabela 3), mostrados por mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) e paramétricos mostrados por média e desvio padrão (Tabela 4). De modo geral as dosagens comportaram-se com grande variabilidade em cada animal. Os biomarcadores

IL-4 e CNTF apresentavam-se mais elevados ( $p < 0,05$ ) no pós-tratamento no grupo ACTZ25 em relação ao veículo, mas não em relação ao grupo Sham. No pré-estudo o valor apresentado do CNTF como mediana refere-se a apenas um único animal, enquanto nos demais não foram detectados. A IL-4 também estava elevada no pré-tratamento no grupo ACTZ25. A mediana da dosagem da IL-4 no pós-estudo no grupo SHAM refere-se a um único animal. A CINC-3 apresentou um resultado no grupo ACTZ25 marginalmente significativo no pós-tratamento em relação ao veículo ( $p = 0,0547$ ), fato este que merece atenção em futuros estudos tanto experimentais como clínicos.

**TABELA 3.** Valores da mediana e intervalo interquartil de biomarcadores (pg/mL) referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Veículo, Sham e ACTZ25 em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 4 (pré) e 6 (pós) ratos do grupo Sham.

Biomarcador	Grupo	Pré-tratamento		Pós-tratamento	
		Mediana	Intervalo interquartil	Mediana	Intervalo interquartil
IL-1 $\alpha$	Veículo	981,00	0 a 3894,00	335,00	0,00 a 4341,50
	Sham	0,00	0,00 a 0,00	0,00	0,00 a 74,25
	ACTZ25	0,00	0,00 a 955,00	0,00	0,00 a 884,00
	Signif inter	KW=4,025	p=0,1336	KW=2,824	p=0,2436
IL-4	Veículo	0,00	0,00 a 0,00	0,00	0,00 a 0,00
	Sham	0,00	0,00 a 0,00	0,00	0,00 a 0,50
	ACTZ25	1,00*	0,00 a 3,00	2,00*	0,50 a 3,00
	Signif inter	KW=6,300	p=0,0429	KW=7,596	p=0,0224
CINC-3	Veículo	0,00	0,00 a 0,00	0,00	0,00 a 39,50
	Sham	0,00	0,00 a 0,00	0,00	0,00 a 43,25
	ACTZ25	63,41*	31,82 a 86,69	90,78	31,35 a 108,68
	Signif inter	KW=12,223	p=0,0022	KW=5,812	p=0,0547
GM-CSF	Veículo	0,00	0,00 a 32,00	181,00	0,00 a 327,50
	Sham	58,00	12,25 a 465,25	0,00	0,00 a 86,00
	ACTZ25	0,00	0,00 a 108,00	100,00	0,00 a 103,00
	Signif inter	KW=3,000	p=0,2231	KW=3,038	p=0,2189
$\beta$ NGF	Veículo	0,00	0,00 a 237,50	0,00	0,00 a 208,00
	Sham	272,50	51,25 a 382,00	281,50	0,00 a 592,00
	ACTZ25	0,00	0,00 a 188,00	454,00	259,00 a 629,00
	Signif. inter	KW=2,785	p=0,2484	KW=3,805	p=0,1491
VEGF	Veículo	4,00	0,00 a 19,00	6,00	2,50 a 27,50
	Sham	0,00	0,00 a 12,00	0,00	0,00 a 22,75
	ACTZ25	11,00	5,00 a 17,50	17,00	9,00 a 26,00
	Signif inter	KW=1,409	p=0,4943	KW=3,731	p=0,1548
CNTF	Veículo	0,00	0,00 a 556,50	0,00	0,00 a 0,00
	Sham	0,00	0,00 a 0,00	0,00	0,00 a 78,50
	ACTZ25	0,00	0,00 a 0,00	91,00*	31,50 a 108,50
	Signif inter	KW=1,800	p=0,4066	KW=6,304	p=0,0428

KW: Estatística de Kruskal-Wallis com comparações de Dunn; \*p < 0,05: ACTZ25 *versus* Veículo (pós-tratamento). Não foi comprovado diferença nas comparações aos pares pelo teste de Dunn ou Wilcoxon (p > 0,05).

**TABELA 4.** Valores da média e desvio padrão de biomarcadores (pg/mL) referentes às medições efetuadas nos animais dos grupos Veículo, Sham e ACTZ25 em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 4 (pré) e 6 (pós) ratos do grupo Sham

Biomarcador	Grupo	Pré-tratamento		Pós-tratamento	
		Média	±Desvio padrão	Média	±Desvio padrão
Fractalkine	Veículo	1685,80	1291,45	2832,80	3519,93
	Sham	2044,75	1826,68	1606,67	1025,45
	ACTZ25	1540,00	1071,51	2595,80	821,59
	Significância (intergrupos)	F=0,1515	p=0,8612	F=0,5358	p=0,5976
Lix	Veículo	33309,00	12276,10	44286,60	27139,79
	Sham	21735,50	12638,83	34361,50	13349,23
	ACTZ25	36415,60	17009,92	52554,00	23550,55
	Significância (intergrupos)	F=1,2684	p=0,3194	F=0,9790	p=0,4018
CINC-2	Veículo	927,20	865,72	729,80	566,05
	Sham	879,75	819,25	1383,02	1344,91
	ACTZ25	75,80	73,19	130,40	103,15
	Significância (intergrupos)	F=2,4271	p=0,1339	F=2,6979	p=0,1047

Comparações entre os três grupos em cada fase foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma das fases ( $p=0,05$ ).

## 5.4 Análise dos parâmetros sistêmicos (ou do Perfil de segurança)

### 5.4.1 Hematimetria eritrocitária

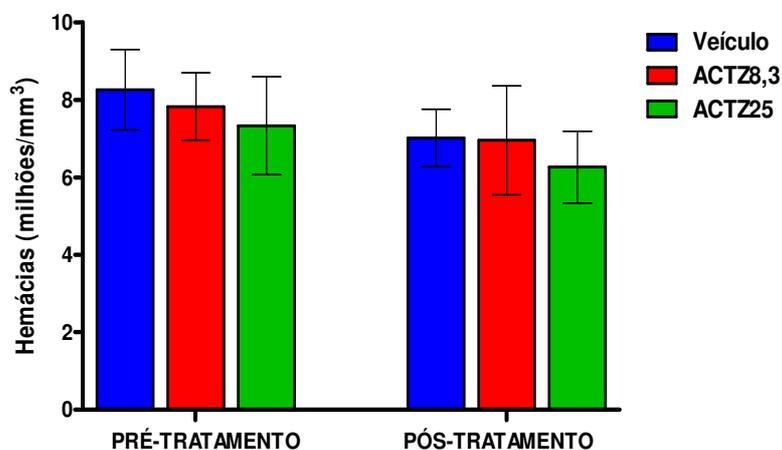
A acetazolamida tem grande afinidade pelos eritrócitos e discrasias sanguíneas podem acontecer com o uso crônico. A enzima anidrase carbônica é a responsável pela troca gasosa dos eritrócitos.

Os valores do pré-tratamento foram considerados como padrão de normalidade. As análises realizadas foram: contagem de hemácias, dosagens de hemoglobina e hematócrito.

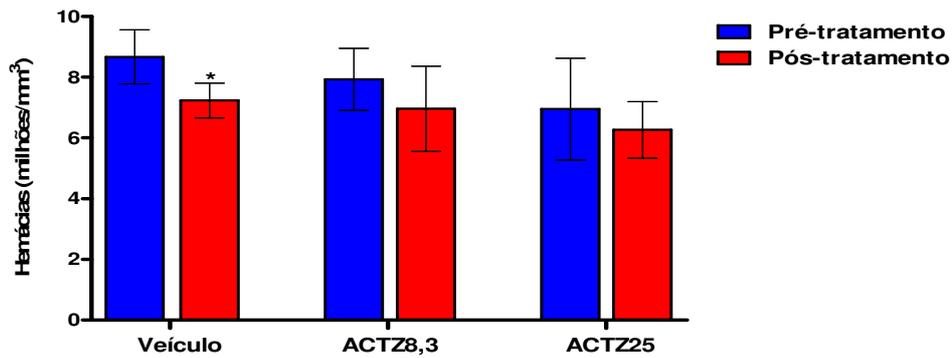
A contagem de hemácias (Figuras 18 e 19), bem como do hematócrito (Figuras 22 e 23) não mostraram alterações estatisticamente significantes entre o pré e pós-tratamento envolvendo a acetazolamida na dose de 25 mg/Kg e seu controle.

A dosagem de hemoglobina foi menor estatisticamente significante no pós-tratamento em todos os grupos, portanto, não podemos associar nem descartar a toxicidade da acetazolamida neste dado (Figuras 20 e 21).

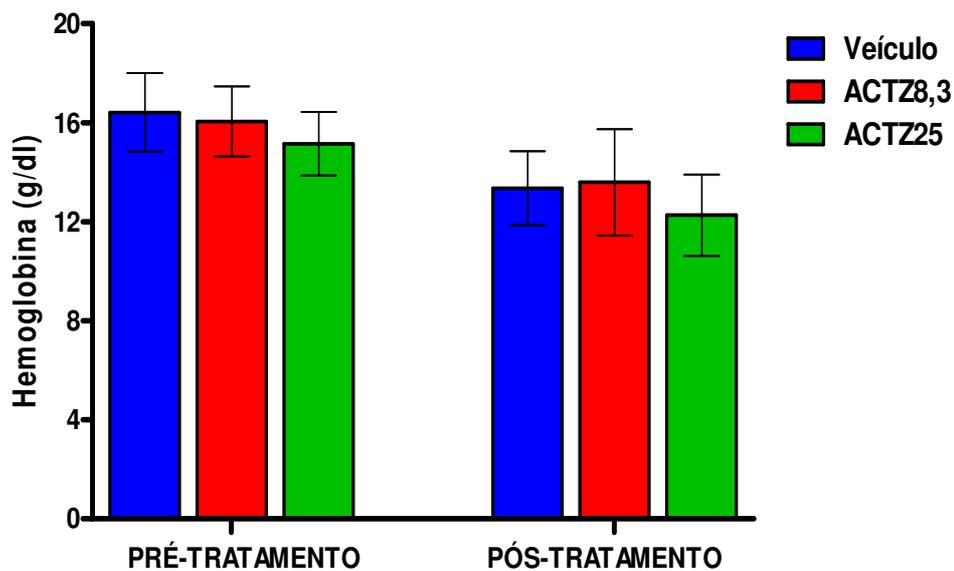
As análises comparativas entre os três tratamentos em cada fase desses estudos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. O teste de *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo num mesmo grupo. Os resultados estão mostrados em gráficos de pré e pós-tratamento abaixo



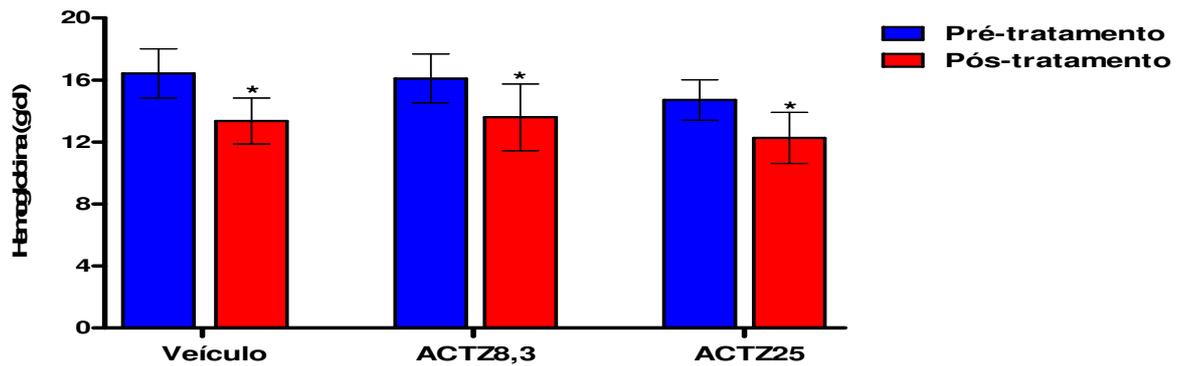
**FIGURA 18.** Contagem de hemácias realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



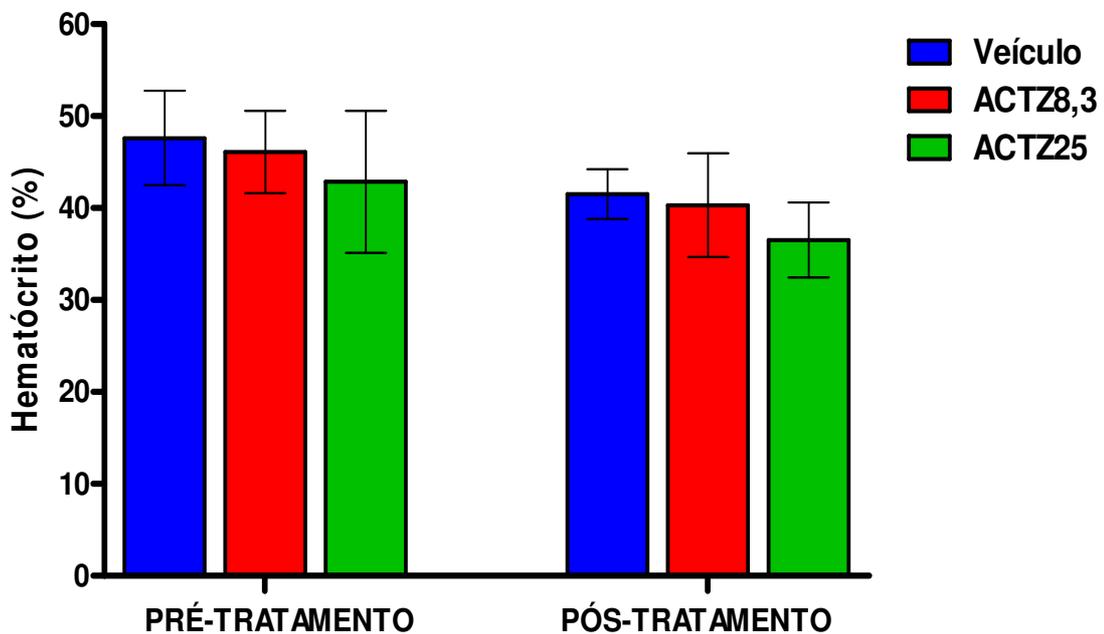
**FIGURA 19.** Contagem de hemácias realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3 (\* $p=0,0194$ ).



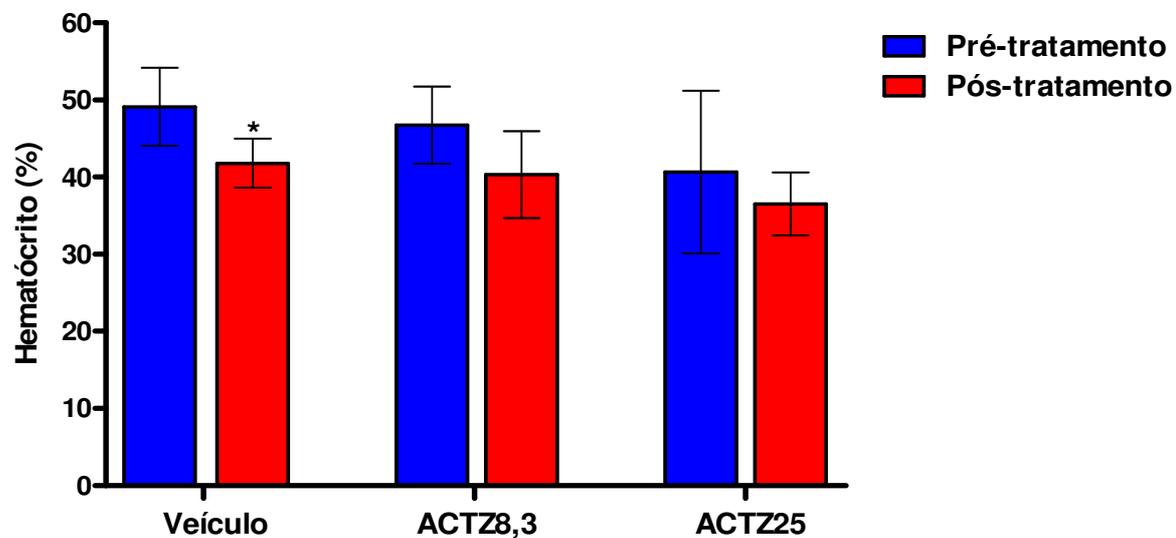
**FIGURA 20.** Concentração de hemoglobina mensurada nas fases de pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p>0,05$ ).



**FIGURA 21.** Concentração de hemoglobina mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25. Veículo (\* $p = 0,0107$ ), ACTZ8,3 (\* $p = 0,0265$ ), ACTZ25 (\* $p = 0,0445$ ).



**FIGURA 22.** Valores do hematócrito mensurados no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 23.** Valores do hematócrito mensurados no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25 considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais dos grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3 (\* $p = 0,0464$ ).

#### 5.4.2 Série leucocitária

Os resultados estão apresentados em gráficos mostrando o pré e pós-tratamento das seguintes variáveis: números de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas. Estes mostraram alterações compatíveis com o processo inflamatório periodontal induzido. A acetazolamida não pareceu alterar os resultados nas doses estudadas.

Os valores de normalidade em ratos são variados e os valores considerados basais serviram de padrão de normalidade. Os animais foram analisados de modo intra e intergrupos nos momentos pré e pós-tratamento.

Os dados demonstram uma leucocitose pronunciada com neutrofilia 11 dias após ligadura (pós-tratamento) no grupo veiculo e ACTZ25 (Figuras 24,25, 26 e 27).

Eosinopenia e linfocitopenia, em números relativos, foram encontradas no pós-tratamento tanto no grupo veiculo como nos grupos ACTZ8,3 e 25, respectivamente, em relação ao pré-tratamento (Figuras 28,29, 30 e 31).

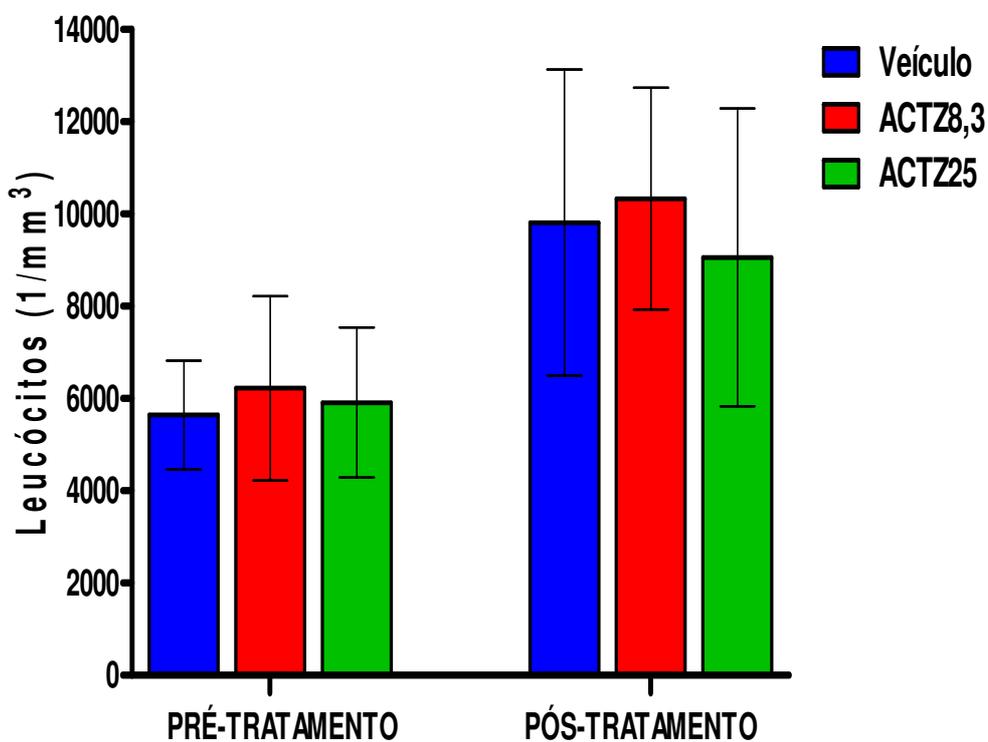
A contagem de basófilos no grupo ACTZ25 mostrou-se elevada no pós-tratamento em relação ao veiculo e ACTZ8,3, mas não em relação ao pré-tratamento, este dado parece revelar uma variabilidade ocasional do grupo, principalmente por que a elevação da média neste grupo pode ser creditada a um único animal. Monócitos não se alteraram significativamente neste modelo (Figuras 32, 33, 34 e 35).

As plaquetas mostraram-se sensíveis à condição de ligadura dos animais com aumento no grupo veiculo e ACTZ8,3 (Figuras 36 e 37).

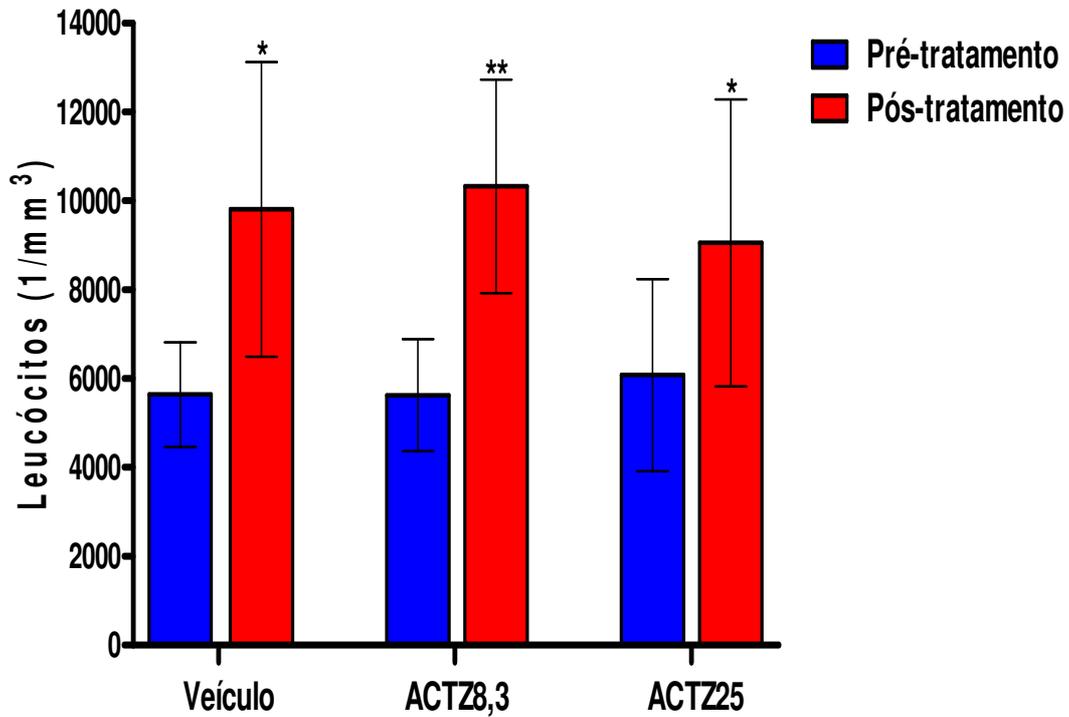
De modo geral os resultados parecem sugerir que a indução da doença periodontal é o fator mais importante no leucograma, não sendo influenciada pela acetazolamida.

Comparações entre os três tratamentos em cada fase foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo num mesmo grupo.

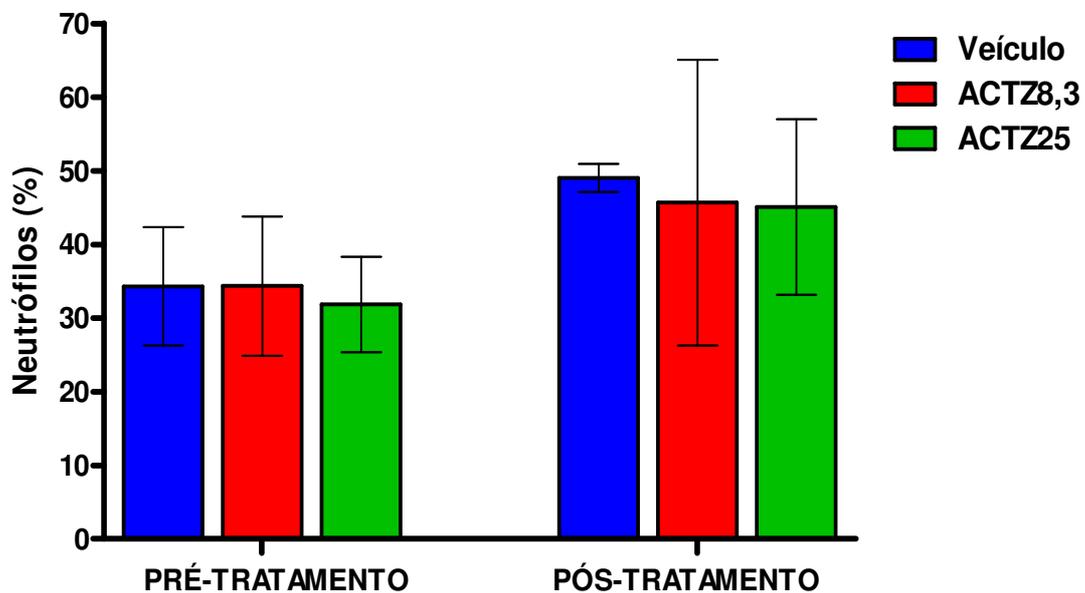
Na avaliação de monócitos as comparações entre os três grupos em cada fase foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois e o teste de Wilcoxon foi usado para comparar as duas fases do estudo num mesmo grupo.



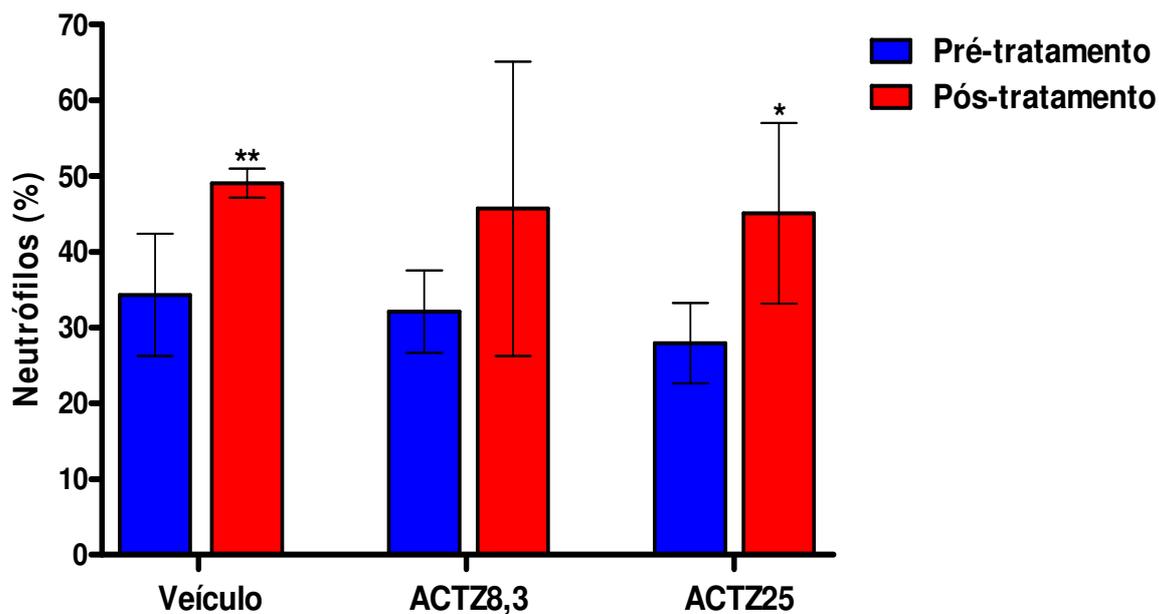
**FIGURA 24.** Contagem de leucócitos realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos em nenhuma das fases ( $p > 0,05$ ).



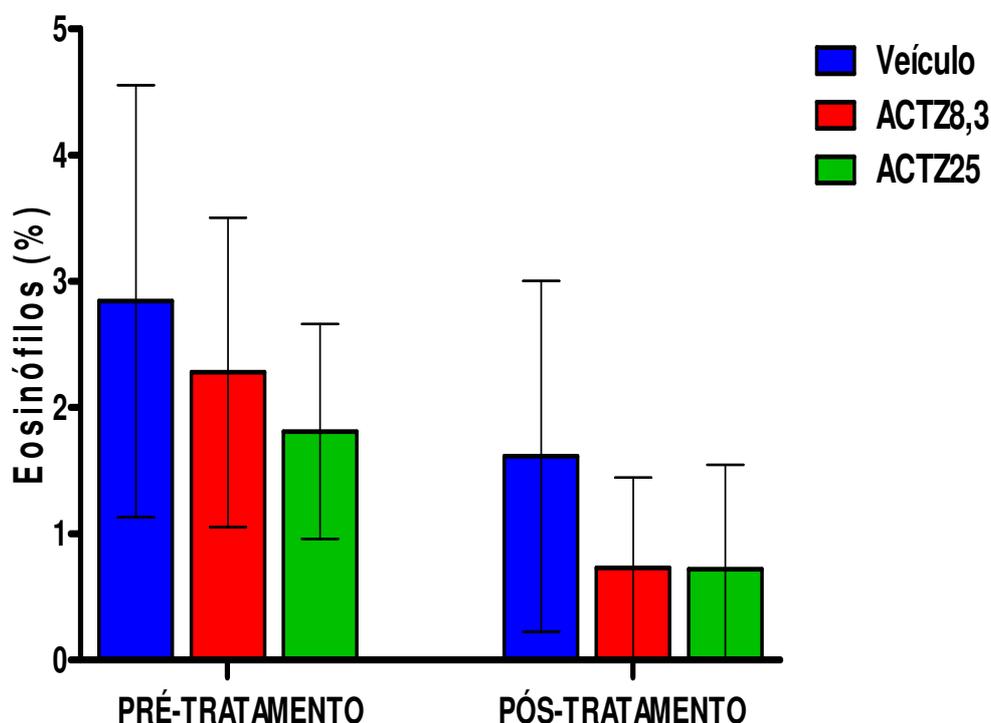
**FIGURA 25.** Contagem de leucócitos realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25 Observou-se que, nos três grupos, o número de leucócitos verificado no pós-tratamento foi significativamente maior que o observado no pré-tratamento: Veículo (\* $p = 0,0434$ ), ACTZ8,3 (\*\* $p = 0,0093$ ), ACTZ25 (\* $p = 0,0132$ ).



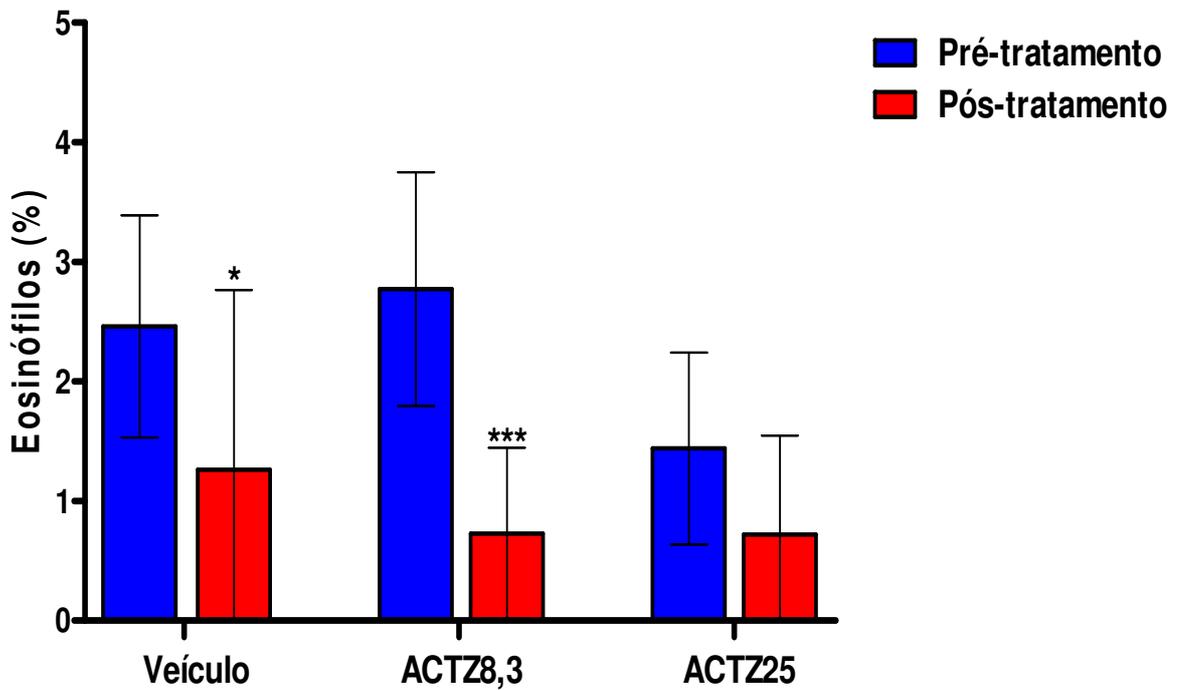
**FIGURA 26.** Quantificação de neutrófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25. ( $p > 0,05$ ).



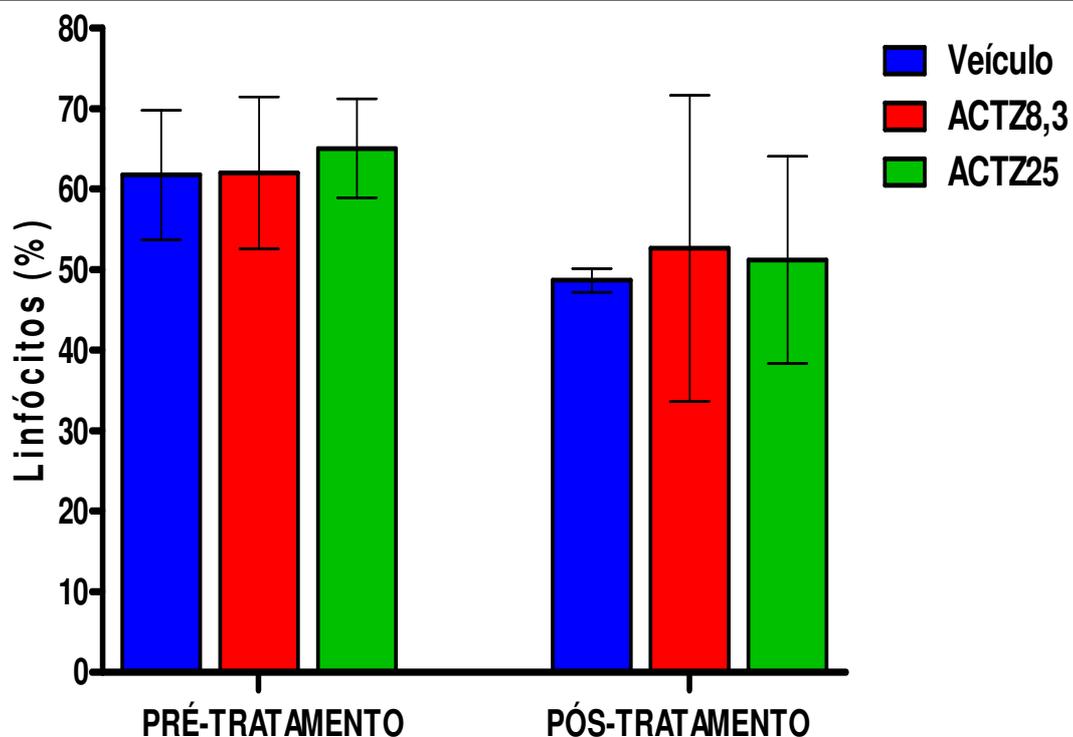
**FIGURA 27.** Quantificação de neutrófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25. Veículo (\*\* $p = 0,0017$ ) e ACTZ25 (\* $p = 0,0135$ ).



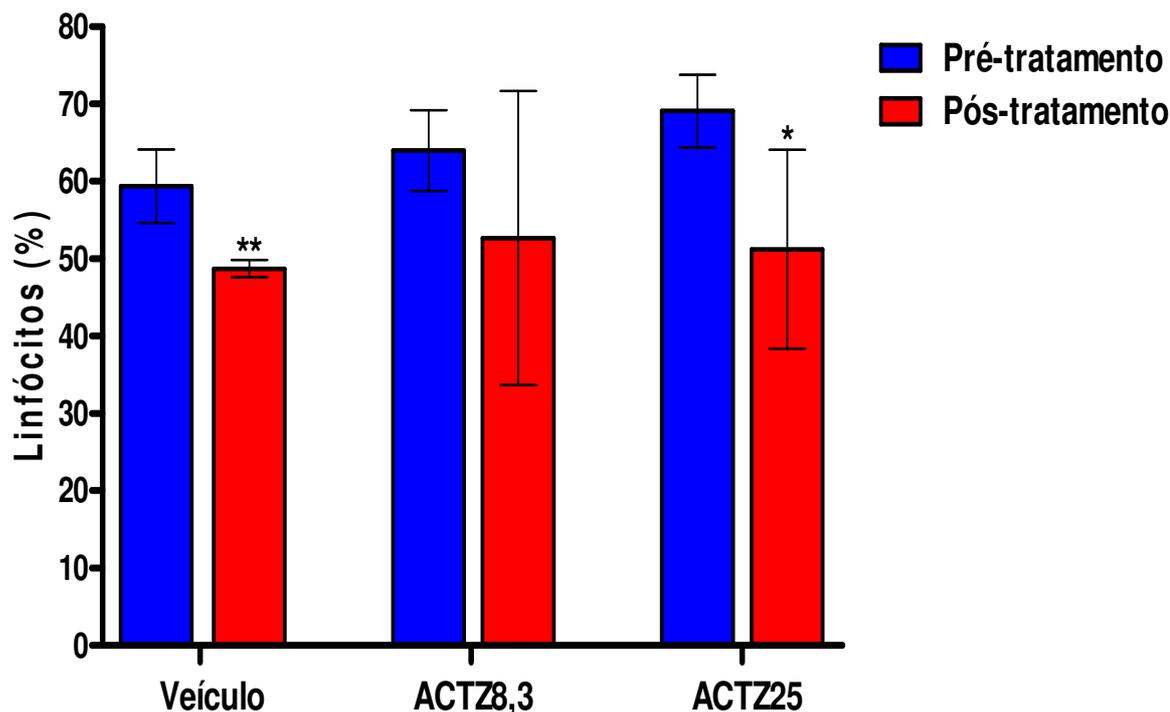
**FIGURA 28.** Quantificação de eosinófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



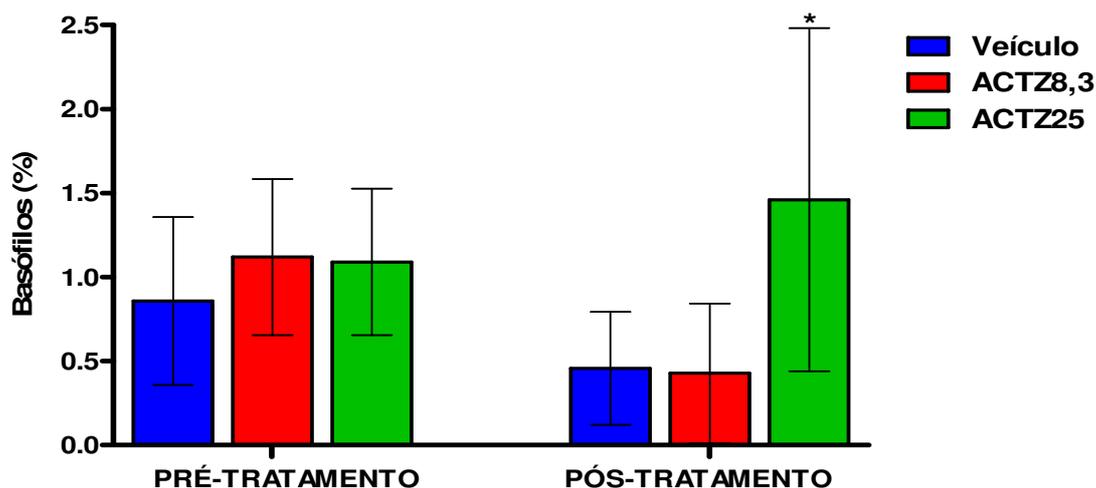
**FIGURA 29.** Quantificação de eosinófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3. Entretanto, na análise intragrupo, observou-se que, nos grupos Veículo (\* $p = 0,0267$ ) e ACTZ8,3 (\*\* $p = 0,0007$ ), houve uma redução significativa dos eosinófilos no pós-tratamento em relação à fase de pré-tratamento.



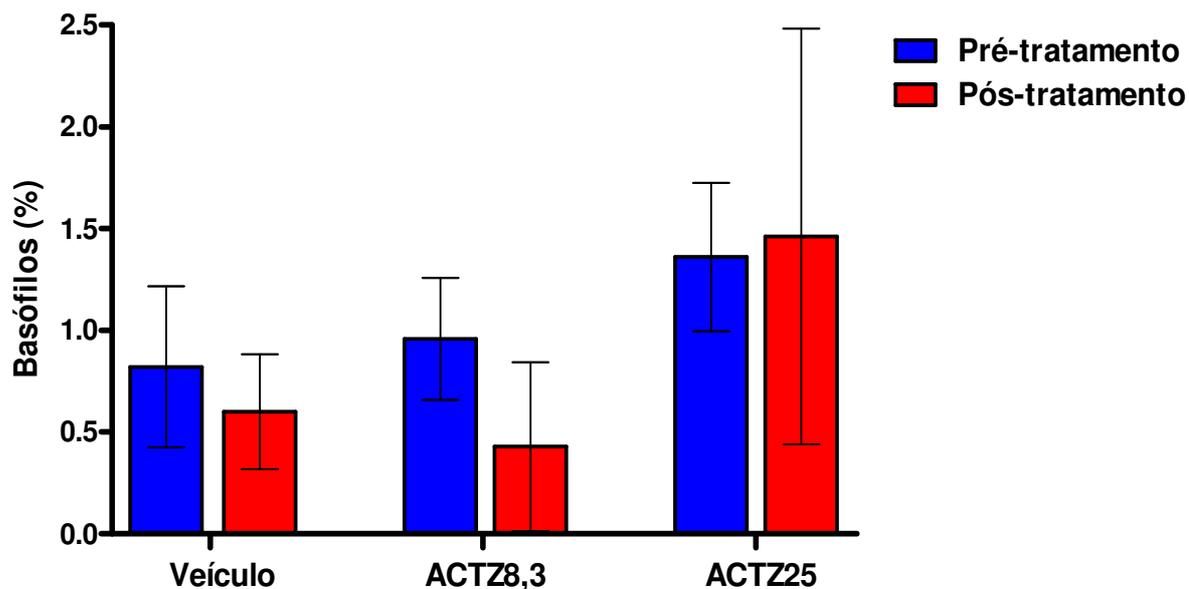
**FIGURA 30.** Quantificação de linfócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



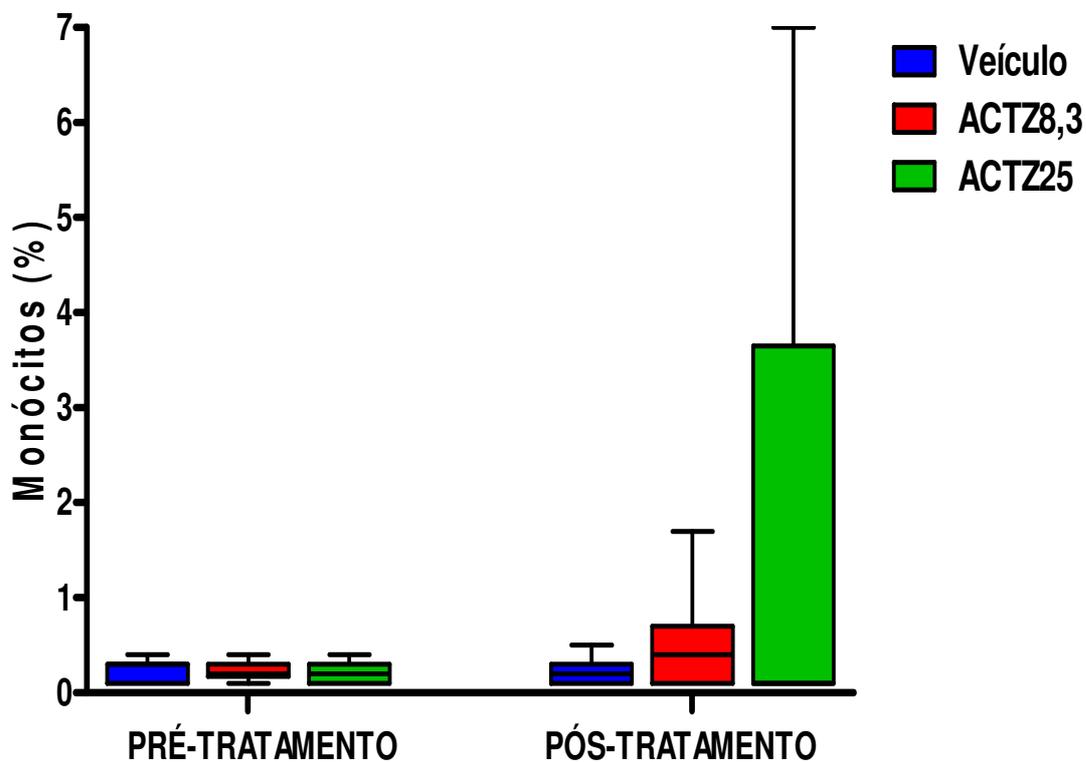
**FIGURA 31.** Quantificação de linfócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3. Observou-se que, nos grupos Veículo (\*\* $p = 0,0049$ ) e ACTZ25 (\* $p = 0,0141$ ).



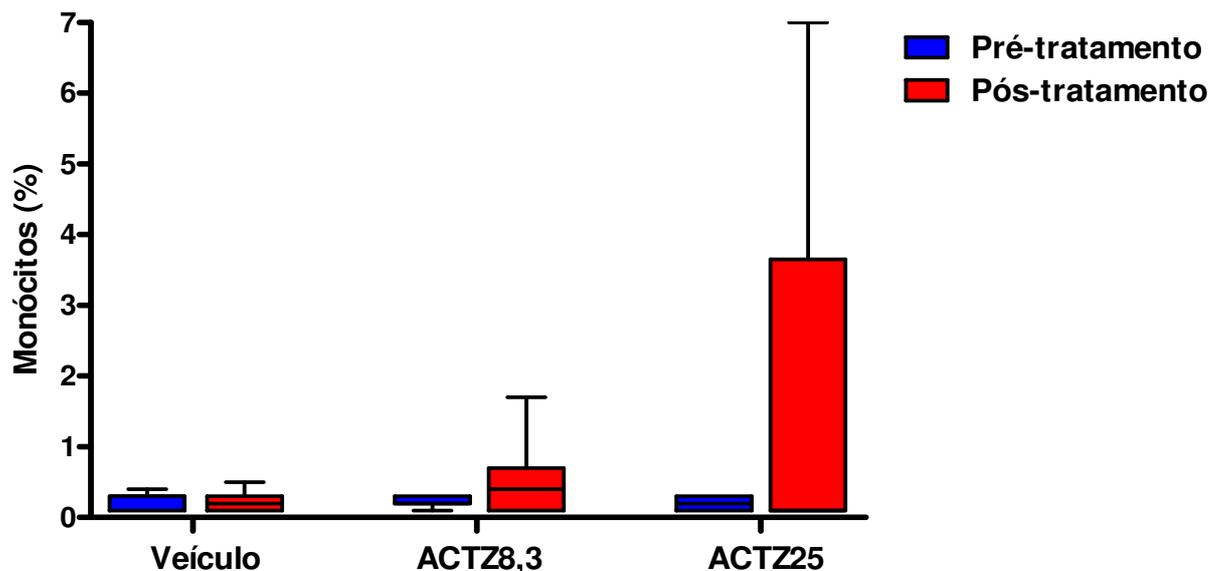
**FIGURA 32.** Quantificação de basófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ). ACTZ25 foi significativamente maior (\* $p < 0,05$ ) que aqueles observados nos grupos Veículo e ACTZ8,3.



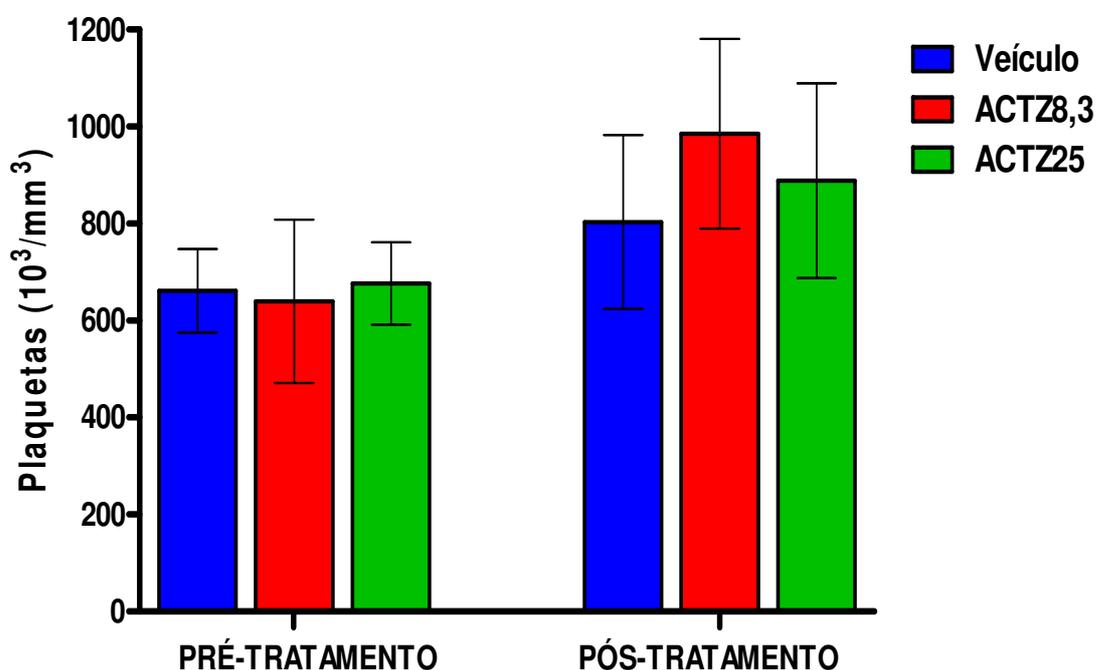
**FIGURA 33.** Quantificação de basófilos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupos Veículo e ACTZ25 e 7 ratos do grupo ACTZ8,3 ( $p > 0,05$ ).



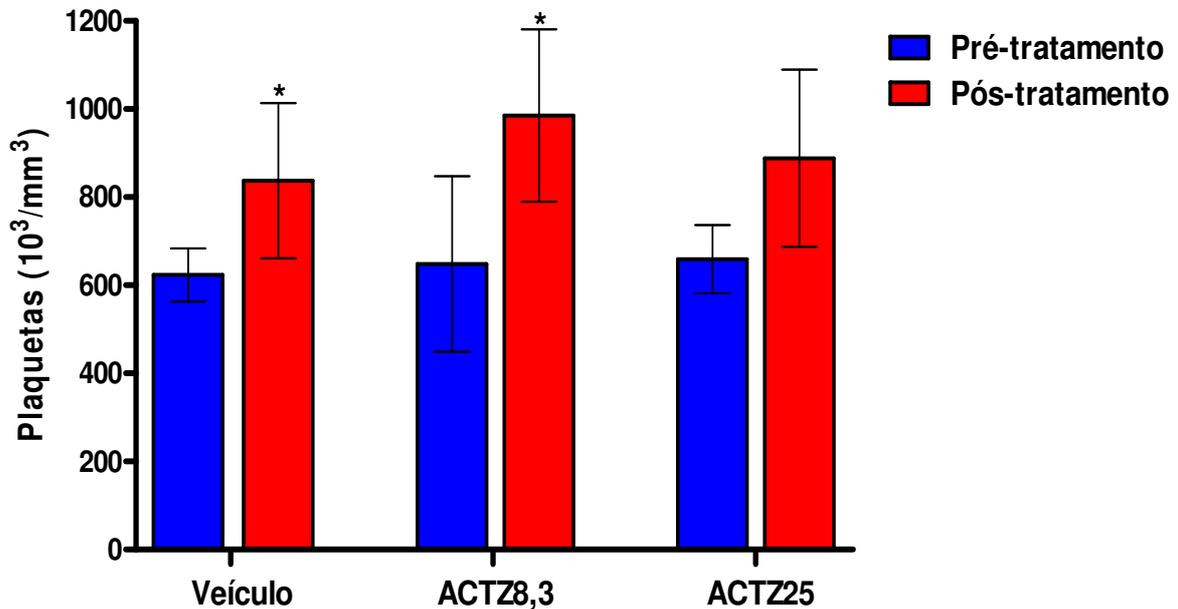
**FIGURA 34.** Quantificação de monócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 35.** Quantificação de monócitos, em termos relativos (percentuais), realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 36.** Contagem de plaquetas realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 10 (pré) e 5 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).

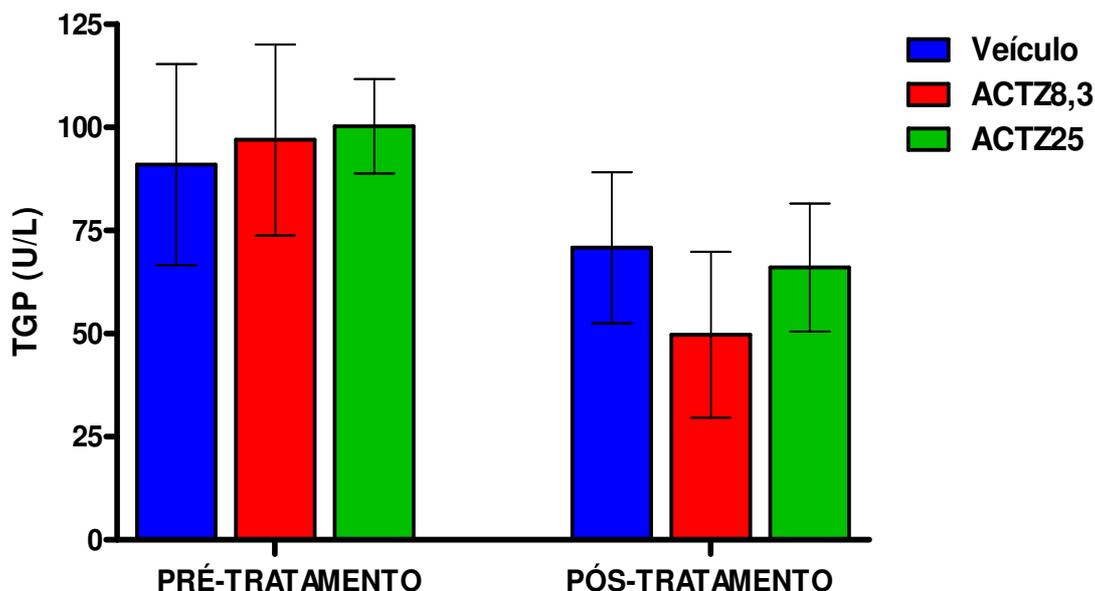


**FIGURA 37.** Contagem de plaquetas realizada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25 considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 animais dos grupos Veículo e ACTZ8,3 e 5 ratos do grupo ACTZ25. Constatou-se que, nos grupos Veículo (\*p = 0,0369) e ACTZ8,3 (\*p = 0,0413), houve um aumento significativo no número de plaquetas no pós-tratamento em relação à fase de pré-tratamento.

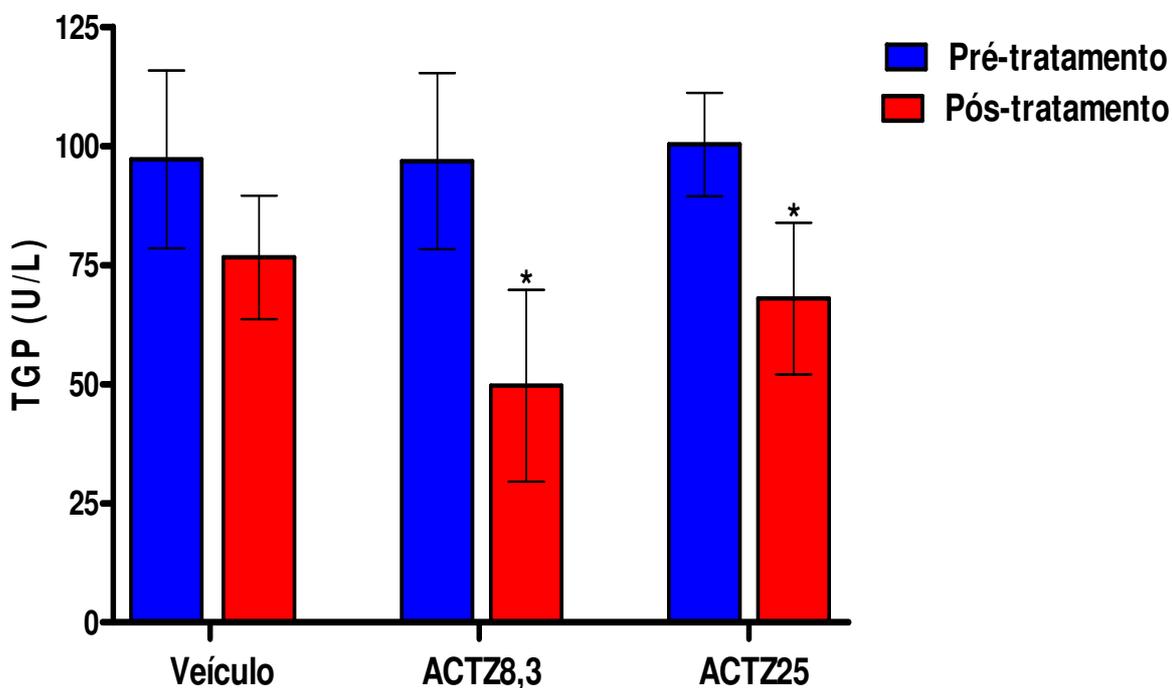
#### 5.4.3 Dosagens de enzimas hepáticas

As dosagens das enzimas hepáticas, TGP, TGO e gama glutamil-transferase (gama – GT) estão mostradas em U/L nos gráficos abaixo (Figuras 38, 39, 40, 41, 42 e 43). Os resultados encontrados com a acetazolamida nas doses estudadas não revelaram dano ao hepatócito e nos casos das dosagens de TGP e gama -GT reduziram ao final do estudo. Embora localizadas em vários tecidos como: fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias essas enzimas são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito.

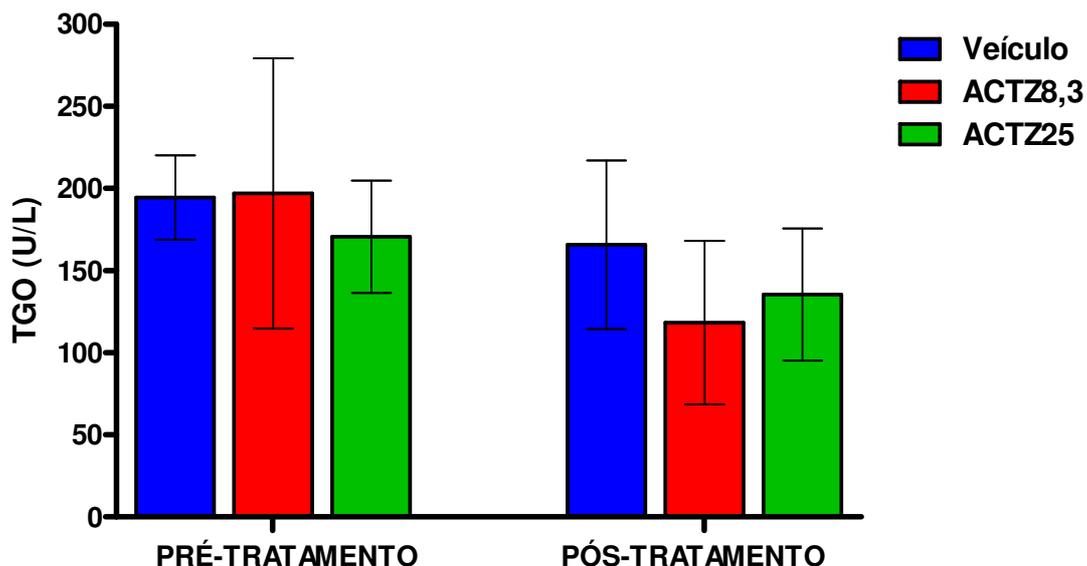
Comparações entre os três tratamentos em cada fase foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo num mesmo grupo.



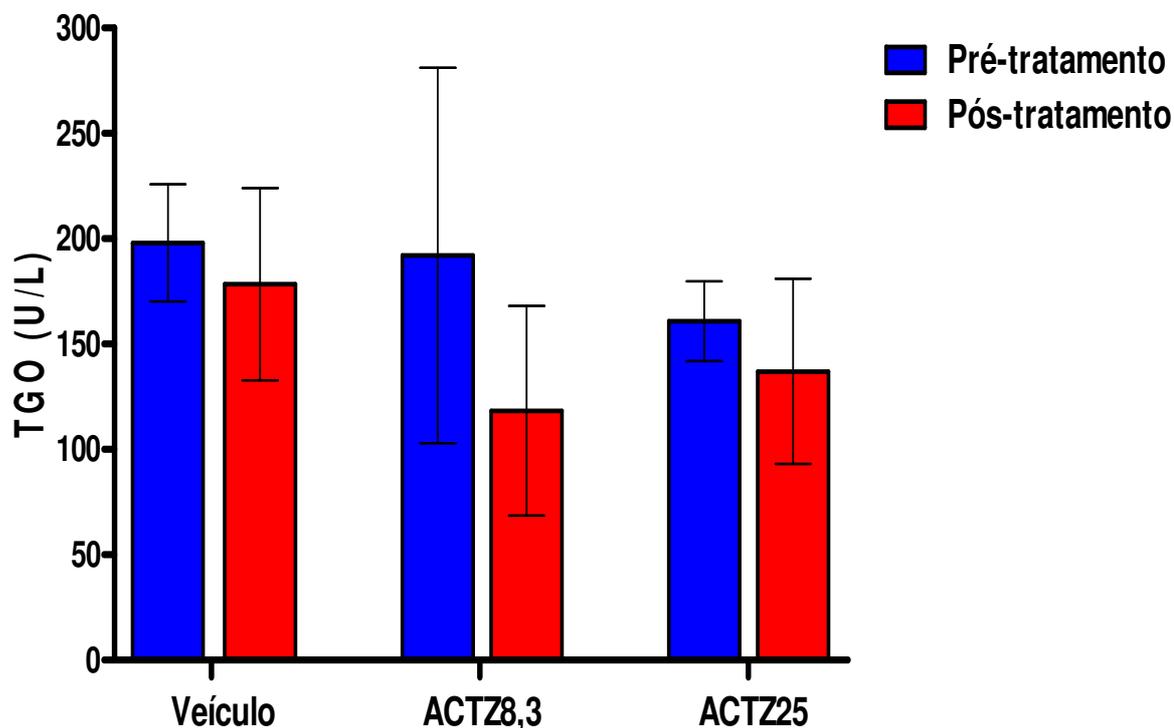
**FIGURA 38.** Concentração sangüínea de TGP mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 (pré) e 6 (pós) animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 9 (pré) e 7 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



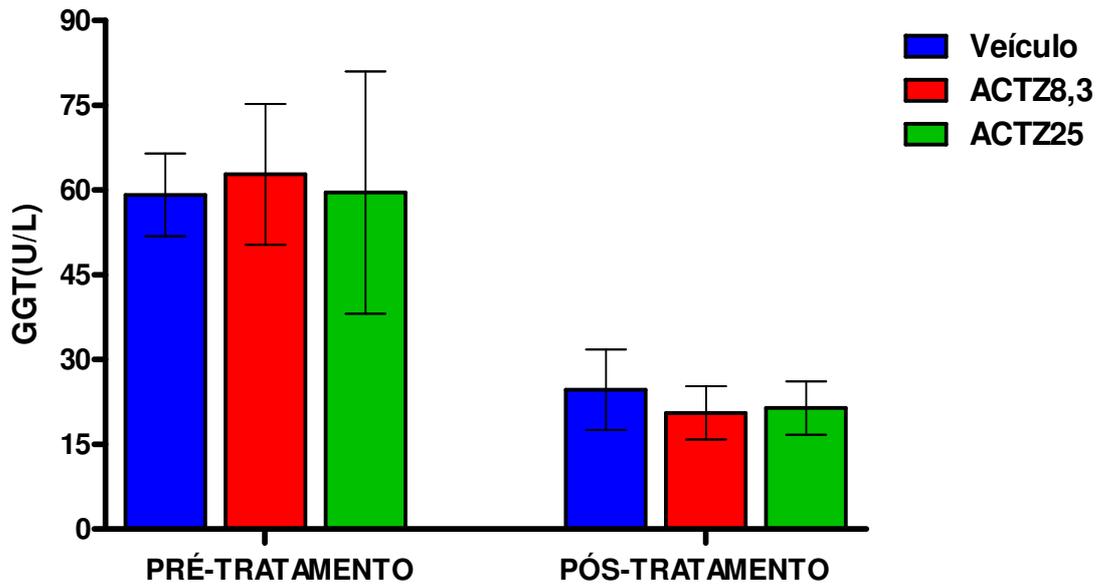
**FIGURA 39.** Concentração sangüínea de TGP mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupo Veículo, 7 ratos do grupo ACTZ8,3 e 6 animais do grupo ACTZ25. Constatou-se que, nos grupos ACTZ8,3 ( $*p = 0,0103$ ) e ACTZ25 ( $*p = 0,0173$ ), houve uma diminuição significativa na concentração de TGP no pós-tratamento em relação à fase de pré-tratamento.



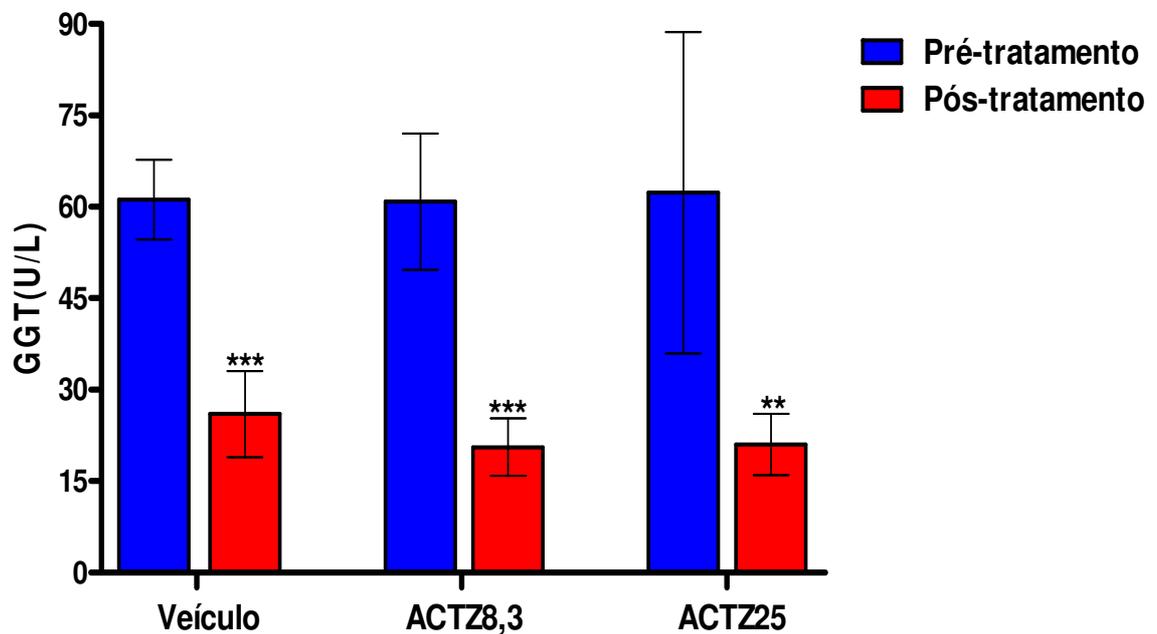
**FIGURA 40.** Concentração sanguínea de TGO mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 (pré) e 6 (pós) animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 9 (pré) e 7 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p>0,05$ ).



**FIGURA 41.** Concentração sanguínea de TGO mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupo Veículo, 7 ratos do grupo ACTZ8,3 e 6 animais do grupo ACTZ25 ( $p>0,05$ ).



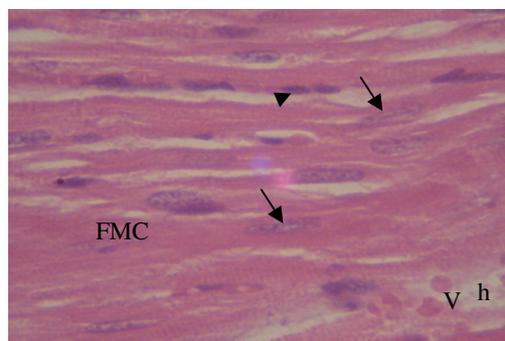
**FIGURA 42.** Concentração sangüínea de gama glutamil-transferase (GGT) mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 7 (pré) e 6 (pós) animais do grupo Veículo; 10 (pré) e 7 (pós) ratos do grupo ACTZ8,3; 9 (pré) e 7 (pós) animais do grupo ACTZ25 ( $p > 0,05$ ).



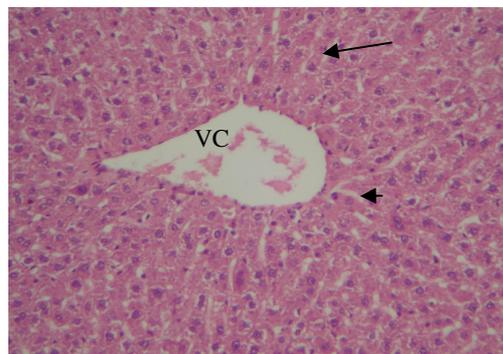
**FIGURA 43.** Concentração sangüínea de gama glutamil-transferase (GGT) mensurada no pré e pós-tratamento nos grupos Veículo, ACTZ8,3 e ACTZ25, considerando apenas os animais que completaram a fase de pós-tratamento. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 5 animais do grupo Veículo, 7 ratos do grupo ACTZ8,3 e 6 animais do grupo ACTZ25. Constatou-se que, nos três grupos, a concentração de GGT no pré-tratamento foi significativamente maior que a observada no pós-tratamento: Veículo (\*\*\*)  $p = 0,0005$ ), ACTZ8,3 (\*\*\*)  $p = 0,0001$ ), ACTZ25 (\*\*)  $p = 0,0079$ ).

#### 5.4.4 Histopatologia dos órgãos

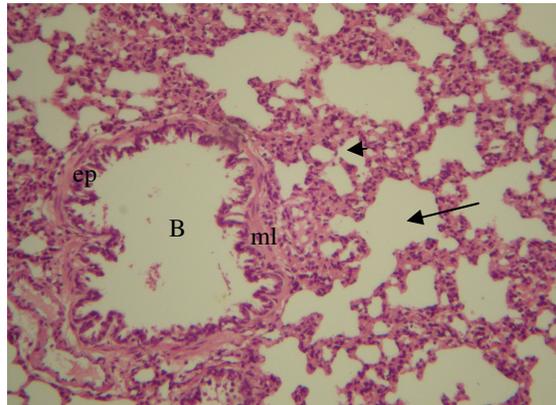
As análises microscópicas dos cortes de diferentes órgãos (coração, fígado, pulmão, rim e baço) dos animais tratados com acetazolamida 25 mg/Kg quando comparados com os animais que receberam o veículo, sob microscopia de luz, não revelaram modificação histologicamente detectável mantendo os órgãos sua organização estrutural normal (Figuras 44, 45, 46, 47 e 48 respectivamente). Os resultados estão demonstrados de modo descritivo em cada órgão abaixo.



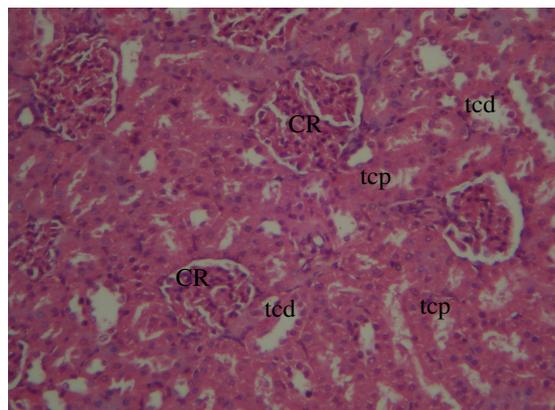
**Figura 44.** Corte longitudinal apresentando as características histológicas típicas da superfície interna do coração na porção subendocárdica, miocárdio, com fibras musculares cardíacas (FMC) alongadas e mononucleadas, contendo núcleo central (seta). Entre as fibras há tecido conjuntivo de preenchimento fracamente corado (endomísio) com núcleos menores (ponta de seta). No tecido conjuntivo estão presentes pequenos vasos (V) com hemácias (h). Aumento de 400x; coloração de rotina em hematoxilina e eosina (HE).



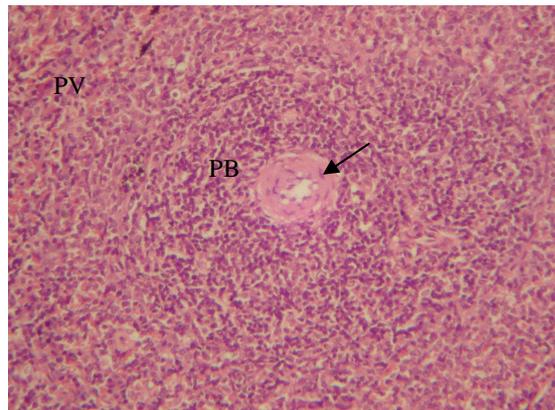
**Figura 45.** Corte transversal de um lóbulo hepático evidenciando veia central ou vênula hepática terminal (VC); as células hepáticas (hepatócitos) seccionadas aparecem como cordões interconectantes de um ou mais hepatócitos poligonais com núcleos esféricos centrais (seta), constituindo cerca de 80% da população de células do fígado. Os sinusóides (ponta de seta) aparecem como áreas claras entre os cordões de células. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE.



**Figura 46.** Fotomicrografia mostrando a porção respiratória da árvore brônquica. Visualização de um bronquíolo (B) em corte transversal com parede contendo epitélio de revestimento (ep) e feixes de músculo liso (ml). Nesta parede, o tecido conjuntivo é mínimo neste aumento, não sendo evidenciado. Apesar disto ele está presente e separa o músculo em feixes (isto é, a camada muscular não é uma camada contínua única). Circundando o bronquíolo, compreendendo a maior parte da substância pulmonar, estão os ductos alveolares (seta) e alvéolos (ponta de seta), que são espaços aéreos circundados pela parede alveolar. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE.



**Figura 47.** Fotomicrografia de um corte do córtex renal contendo corpúsculos renais (CR), que aparecem como estruturas esféricas relativamente grandes, e seus túbulos contorcidos distais (TCD) e proximais (TCP) associados. Ao contrário dos túbulos distais, os proximais exibem borda em escova com diâmetro externo maior, e muitos mostram uma luz estrelada. Os túbulos contorcidos, sobretudo os proximais, em virtude de suas tortuosidades apresentam-se em vários perfis, a maioria dos quais é oval ou circular, outros mais alongados ou em diferentes formas. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE.



**Figura 48.** Fotomicrografia do baço revelando seus dois componentes principais, a polpa vermelha (PV) e a polpa branca (PB); a polpa vermelha constitui a maior parte do tecido esplênico. A polpa branca contém um tecido linfóide que acompanha e envolve a artéria central (seta). A expansão da polpa branca cria os nódulos esplênicos. Aumento de 100x; coloração de rotina em HE.

#### 5.4.5 Medida dos pesos dos animais

As medidas de pesos foram feitas em vários momentos e em vários grupos, para representar esse aspecto selecionou-se o grupo de ACTZ25 e o seu controle num estudo de 17 dias. A queda inicial dos pesos dos animais reflete a dificuldade de alimentação em virtude da cirurgia de ligadura na maxila. Em nenhum momento encontramos diferença significativa entre os pesos, (Tabela 5) fato que corrobora com a boa tolerabilidade da acetazolamida nesta dose.

**TABELA 5.** Média e desvio padrão do peso dos animais por dias de avaliação segundo o grupo.

Tempo	Controle		Acetazolamida		Valor de p
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Dia 1	209,89	7,71	216,90	23,85	p <sup>(1)</sup> = 0,399
Dia 2	202,13	9,58	204,70	25,18	p <sup>(2)</sup> = 0,789
Dia 3	206,88	9,95	202,78	23,73	p <sup>(2)</sup> = 0,657
Dia 4	206,63	9,83	203,78	21,52	p <sup>(2)</sup> = 0,736
Dia 5	207,25	9,81	216,00	39,20	p <sup>(1)</sup> = 0,533
Dia 6	209,25	9,59	207,33	25,27	p <sup>(2)</sup> = 0,843
Dia 7	208,57	5,22	211,67	26,98	p <sup>(2)</sup> = 0,771
Dia 8	210,63	11,31	208,78	26,86	p <sup>(2)</sup> = 0,859
Dia 9	209,50	10,65	213,78	30,01	p <sup>(2)</sup> = 0,708
Dia 10	213,43	15,48	211,44	30,28	p <sup>(2)</sup> = 0,877
Dia 11	213,57	16,84	217,13	28,41	p <sup>(2)</sup> = 0,777
Dia 12	215,29	19,54	219,13	25,94	p <sup>(2)</sup> = 0,754
Dia 13	216,86	17,69	221,75	29,26	p <sup>(2)</sup> = 0,707
Dia 14	217,29	17,00	224,25	29,13	p <sup>(2)</sup> = 0,589
Dia 15	220,71	17,92	226,13	28,14	p <sup>(2)</sup> = 0,670
Dia 16	224,57	18,97	228,00	24,63	p <sup>(2)</sup> = 0,770
Dia 17	224,86	19,28	232,38	23,78	p <sup>(2)</sup> = 0,517

**(1):** Através do teste t-Student com variáveis desiguais.

**(2):** Através do teste t-Student com variáveis iguais.



## 6.0 DISCUSSÃO

A doença periodontal é a principal causa de perda de dentes em adultos e pode afetar até 90 % da população (Philstron, 2005). A infecção bacteriana é o fator iniciador do processo de destruição do periodonto ativando células de defesa, principalmente do eixo monócito/macrófago. Estes passam a liberar mediadores que induzem outras células do hospedeiro como fibroblastos e células epiteliais a produzirem prostaglandinas, metaloproteinases de matriz e citocinas pró-inflamatórias. A consequência é a destruição do tecido conjuntivo e ativação de osteoclastos que fazem a lise óssea reabsorvendo o processo alveolar que fornece sustentação aos dentes (REDDY et al., 2003). Esta resposta do hospedeiro induzida tem sido alvo de intensa pesquisa no sentido de se alterar a sua modulação em pacientes selecionados com baixa resposta ao tratamento convencional.

A modulação do hospedeiro por medicamentos sistêmicos na doença periodontal percorre um longo caminho até ser aceito em associação com os tratamentos clínicos convencionais cirúrgicos e não cirúrgicos. Os passos iniciais são normalmente em estudos experimentais e estes têm se mostrado úteis no esclarecimento da patogênese e no desenvolvimento de novos tratamentos desta patologia com novas drogas (BAK et al., 2010; POLAK et al., 2009).

No presente trabalho, utilizamos o modelo de periodontite induzida por ligadura, método aceito em diversos trabalhos envolvendo a modulação do processo inflamatório, da perda óssea alveolar ou relacionando fatores indutores ou protetores da reabsorção (BREIVIK et al., 2005; NOGUEIRA-FILHO et al., 2007; SETO et al., 2007).

Diversos modelos experimentais tem sido propostos para avaliar a interação infecção-hospedeiro no estudo da doença periodontal procurando-se associações de causa e efeito. Não existe um único modelo que represente todos os aspectos da doença periodontal humana e portanto todos tem limitações intrínsecas. Graves et al.,(2008), relacionaram 6 seis modelos animais utilizados na pesquisa da doença periodontal como: 1- modelo em calvária ou de couro cabeludo de camundongos, onde um estímulo inflamatório quimioatraente e indutor de reabsorção óssea é

injetado no tecido conjuntivo que envolve a calota craniana. Este modelo tem se mostrado útil na avaliação do papel de citocinas sobre a osteoclastogênese e a sequência de inflamação, destruição e reparo, os resultados podem ser extrapolados para a doença periodontal.

2- Modelo de gavagem em camundongo humanizado não-obeso e diabético associado com imunodeficiência severa. Consiste na administração por gavagem de *A. actinomycetemcomitans* (AA) e a humanização deste modelo envolve a enxertia de leucócitos do sangue periférico humano e depleção de células natural killer (NK) por anti-NK no animal. A grande vantagem deste modelo é relatada como o único modelo vivo onde é possível estudar o desenvolvimento linfo-hematopoético humano.

3- Modelo experimental de periodontite induzida em camundongo por gavagem oral. A metodologia consiste na administração oral de suspensão viscosa de carboximetilcelulose 2%, em camundongos tipicamente susceptíveis como o BALB/cByJ, contendo uma das seguintes bactérias, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* ou *Porphyromonas gulae*. A perda óssea tem sido estudada neste modelo, bem como a participação de citocinas.

4- Modelo de alimentação contendo *A. actinomycetemcomitans* (AA) em ratos, onde os animais são submetidos a antibioticoterapia prévia para redução da colonização endógena e posteriormente alimentados com ração inoculada com AA. Este modelo tem sido utilizado para estudar os aspectos associados ao comportamento bacteriano de colonização e inicialização da DP.

5 - Modelo de bolsa de ar. Este modelo consiste em injetar 5 cm<sup>3</sup> de ar no dorso de camundongos ou ratos repetindo-se o procedimento após 3 dias que se enche de fluido revestido por epitélio. Para a investigação periodontal esta metodologia foi adaptada em 2000 por Pouliot et al., com a injeção de *P. gingivalis* no interior da bolsa. Este modelo tem sido utilizado na avaliação do processo inflamatório agudo e a resposta do hospedeiro a invasão de *P. gingivalis*.

6- Modelo de periodontite experimental por ligadura, este, já descrito na metodologia do presente. Este modelo tem sido utilizado na avaliação de perda óssea alveolar, no papel de citocinas na DP, na avaliação de fatores indutores e protetores de reabsorção óssea e no estudo da osteoclastogênese. Outro modelo apresentado na literatura é o de injeções gengivais repetidas de uma endotoxina (LPS) de *Escherichia Coli*, também servindo de base para estudos envolvendo a perda óssea alveolar, a expressão de citocinas e marcadores de perda óssea (RAMAMURTHY et al., 2002; BUNDUNELI et al., 2005).

O modelo de indução por ligadura está associado à invasão periodontal da microbiota endógena após rompimento da integridade do epitélio sulcular e a presença de um fator local retentivo de placa bacteriana por um fio de nylon ou algodão. A microbiota prevalente em 100% dos animais que receberam fio de nylon foi composta de *Fusobacterium nucleatum*, *Peptoestreptococcus sp* e *Proteus sp*. (MENEZES et al., 2005).

Neste modelo o pico das lesões de reabsorção óssea ocorreu entre o 7° e o 11° dia de indução da ligadura (BEZERRA et al., 2002, de LIMA et al., 2004). No estudo de KUHR et al., 2004, foi demonstrado que a perda óssea induzida em ratos por ligadura do segundo molar superior aumenta até o 15° dia, reduzindo drasticamente nos períodos superiores, muito provavelmente pela posição do fio que tende a superficializar-se com a recessão gengival induzida.

A principal limitação deste modelo é o seu curso rápido de destruição das estruturas periodontais, contrastando com a evolução lenta da principal forma de periodontite humana, a crônica (TOKER et al., 2009).

Diante dos nossos resultados podemos demonstrar que a acetazolamida possui potencial inibidor da perda óssea alveolar na periodontite experimental induzida por ligadura, trata-se de mais um alvo molecular, a anidrase carbônica, a ser explorado na modulação da doença periodontal. Foi demonstrado que a acetazolamida tinha reduzido a reabsorção dentária em dentes de ratos reimplantados (MORI et al., 2006), porém, esse é o primeiro trabalho que demonstra eficácia na redução de reabsorção óssea alveolar na periodontite experimental. O mecanismo de ação proposto e já atestado na literatura seria por redução da produção de prótons e sua extrusão dentro das vesículas em osteoclastos maduros através da inibição da enzima anidrase carbônica tipo II, bem como no processo de diferenciação dos mesmos (LEHENKARI et al., 1998). Duas anidrases carbônicas podem vir a ser mais exploradas na pesquisa odontológica, a tipo II pela sua associação com o papel fisiopatológico dos osteoclastos e a anidrase carbônica tipo VI que está presente na película adquirida do esmalte podendo participar da acidificação microbiana que

resulta do processo de formação das cáries. A acetazolamida inibe todas as enzimas anidrases carbônicas, exceto a tipo III (NISHIMORI et al., 2007).

Acetazolamida na concentração de  $10^{-4}$ M não reduziu o número de osteoclastos no estudo em calvária de ratos (OHBA et al., 1996).

O alendronato sódico e outros bifosfonatos são reconhecidamente protetores de perda óssea alveolar na doença periodontal experimental (MENEZES et al., 2005). Nesse estudo, o alendronato foi o controle positivo e assim como a acetazolamida ambos protegeram o periodonto de perda óssea induzida em relação aos seus veículos.

Nosso estudo trabalhou com doses de acetazolamida de 8,3, 25 e 75 mg/Kg/dia. A faixa de variação de doses em humanos está situada entre 3,8 a 22 mg/Kg/dia (REISS; OLES, 1996), como a dose de 25 mg/Kg/dia mostrou-se eficaz na proteção óssea, podemos sugerir que existe uma grande associação entre a acetazolamida e a proteção óssea alveolar periodontal, pois, esta dose sugere uma sub-dose com atividade protetora óssea. Podemos encontrar doses de até 200 mg/kg administradas em ratos por via I.P. em estudos experimentais (RADHAKRISHNAN, SLUKA, 2005).

A periodontite é uma doença crônica e a utilização de medicamentos acessórios ao tratamento clínico não cirúrgico deve prever este emprego por um período longo a moderado. A acetazolamida vem sendo indicada para doenças crônicas como o glaucoma (JOYCE, MILLS, 1990; JOYCE et al., 1989) e nas crises epiléticas não controladas por outras drogas (RESOR, RESOR, 1990; REISS; OLES, 1996).

Outro achado que corrobora com o resultado principal deste estudo foram as análises histológicas do periodonto abordando o infiltrado inflamatório e a preservação do osso alveolar e cemento que parecem demonstrar uma atividade da acetazolamida restrita aos osteoclastos. A melhor preservação do osso e do cemento, no estudo de 17 dias de indução da doença periodontal apresentando diferença significativa no grupo ACTZ25 em relação ao veículo, corroboram com o fator protetor de reabsorção óssea da acetazolamida. Outro aspecto que sugere que

o mecanismo protetor é independente de uma atividade antiinflamatória foi a condição do infiltrado inflamatório no estudo de 11 dias, onde não ocorreu diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre acetazolamida e o veículo e a reabsorção óssea se manter no mesmo nível. Poucos estudos têm investigado a ação antiinflamatória desta droga. Foi relatado que a acetazolamida promoveu a inibição da liberação do TNF de modo dose dependente em cultura de macrófagos murinos peritoneais estimulados com LPS sob atmosfera de ar ou gás hélio (WEST et al., 1998). A acetazolamida também demonstrou uma atividade antihiperálgica quando administrada em músculos inflamados de ratos revertendo a hiperálgia induzida por carragenina avaliada pelo método da placa quente (RADHAKRISHNAN, SLUKA, 2005).

A doença periodontal experimental produziu significativa leucocitose com neutrofilia, linfocitopenia e eosinopenia relativa após 11 dias de indução quando comparados com o tempo zero (pré-estudo), estes achados estão parcialmente em acordo com os dados de Lima et al., 2004, pois os mesmos encontraram no mesmo período monocitose, embora com dados absolutos. Esses dados sugerem uma repercussão sistêmica da periodontite experimental.

A contagem de plaquetas se elevou após 11 dias de indução de DP, tanto no controle como no grupo ACTZ8,3 significativamente. Muitas evidências tem sido acumuladas associando-se a doença periodontal humana como fator de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares (RAMIREZ-TORTOSA et al., 2010; OFFENBACHER et al., 2009; HIGASHI et al., 2009; BUHLIN et al., 2009; TONETTI, 2009). A isquemia miocárdica e o infarto são geralmente precedidos por eventos tromboembólicos agudos. Agregação de plaquetas pode ser induzida por bactérias do biofilme dental, incluindo *Streptococcus sanguis* e *P. gingivalis*. Infusão intravenosa de *S. sanguis* em coelhos foi demonstrada poder causar alterações no eletrocardiograma (ECG), frequência cardíaca, pressão arterial e contratilidade cardíaca. Estas alterações são consistentes com a ocorrência de infarto do miocárdio (HERZBERG, WEYER, 1998). Este resultado encontrado é insuficiente para qualquer associação com doenças cardiovasculares, porém, é mais uma informação a ser investigada na doença periodontal humana em futuros estudos.

Os biomarcadores dosados neste estudo apresentaram grande variabilidade entre os animais dificultando uma relação passível de ser associada à DP. Dois destes se destacaram no pós-estudo no grupo ACTZ25 em relação ao veículo, a IL-4 e o CNTF. A IL-4 está associada fortemente com aumento da produção de fatores inibidores e precursores da osteoclastogênese como a osteoprotegerina (OPG), bem como na redução de fatores ativadores da atividade osteoclástica como o RANKL e RANK (PALMQVIST et al., 2006; YAMADA et al., 2007). A IL-4 e IL-10 podem induzir macrófagos a liberarem IL-1, TNF, radicais livres intermediários de oxigênio e óxido nítrico (ORINGER-AAP, 2002). Estudos clínicos dosando IL-4 no fluido crevicular associaram-na a remissão da doença periodontal por atividade inibidora de citocinas pró-inflamatórias (PRADEEP et al., 2008). Não existem estudos entre a acetazolamida e a expressão desta citocina com métodos mais direcionados, como em cultura de células. São necessários sistemas isolados para se estabelecer uma relação de causa e efeito entre a ação da acetazolamida e a expressão da IL-4.

Já o CNTF é uma neurotrofina em que até o momento não existem estudos relacionando-a na participação da doença periodontal nem com a acetazolamida. Dentre as neurotrofinas, a BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro) parece estar envolvido na regulação do funcionamento das células do ligamento periodontal na sua regeneração (TAKEDA et al., 2005). Neurotrofinas estão envolvidas na cicatrização óssea pós-fraturas e na regeneração do tecido duro. A secreção do NGF (Fator de crescimento neuronal), outra neurotrofina, foi confirmada por células do ligamento periodontal e ceratinócitos gengivais participando do processo de reinervação durante sua regeneração (KURIHARA et al., 2003).

A acetazolamida tem grande afinidade por eritrócitos e células gliais. No cérebro, essas últimas células, possuem grande quantidade de anidrase carbônica e a acetazolamida pode alcançar o seu interior (RIZZUTI et al., 1999). No sistema nervoso periférico as células de Schwann representam um tipo de célula glial que produz um complexo lipoprotéico denominado de mielina que envolve os axônios dos neurônios neste sistema, isso isola eletricamente os nervos permitindo a propagação rápida de potenciais de ação. Estas células possuem a função crítica

de suporte axonal regenerativo, servindo de via de crescimento para as fibras nervosas (SIQUEIRA, 2007).

Neurotrofinas podem ser a chave para a reinervação, após destruição do periodonto pela doença periodontal. (KURIHARA et al., 2003).

Células não-neuronais também podem expressar neurotrofinas como Linfócitos B, linfócitos T, monócitos, fibroblastos, condrócitos, osteoblastos e células endoteliais e receptores TrK (TSUBOI et al., 2001). O CNTF também conhecido por integrar as famílias das citocinas neuropoiéticas, com representantes diversos, tipo IL-6, IL-11, LIF e oncostatin M, possuem ação pleiotrópica redundante, ou seja, exibe múltiplas atividades biológicas diferentes em diversos sistemas como: imune, hematopético e neural. Este fato é devido ao compartilhamento de uma proteína, a gp 130, que é comum no mecanismo de sinalização dos receptores destes mediadores (SARIOLA, 2001). O dado conflitante entre o CNTF e as outras citocinas relacionadas consiste no fato de que o CNTF está sendo relacionado sempre envolvido no reparo neuronal, enquanto as demais no processo de ativação da atividade osteoclástica. No modelo experimental proposto foi demonstrado que a perda óssea é limitada após o 15º dia (KUHR et al., 2004), como a morte ocorreu em nosso estudo no 11º dia e sinais de reorganização das fibras colágenas já podiam ser notadas nas lâminas do grupo ACTZ25, podemos sugerir que o aumento destas citocinas (IL-4 e CTNF), tipicamente relacionadas aos processos de reparo, sejam mais importante neste momento onde a fase crítica de destruição do periodonto finaliza e uma fase reparadora se inicia. Esta elevação pode estar sendo estimulada pela presença da acetazolamida, porém, esses dados carecem de confirmação posterior em futuras pesquisas.

Destaca-se a grande vantagem da tecnologia de microarray para dosagem desses biomarcadores reside no fato de possibilitar a utilização de uma única amostra de 100 µL de soro para dosagem de todos ao mesmo tempo, no mesmo animal e poder avaliar o comportamento de um em relação ao outro. Esta tecnologia ainda está no início da sua popularização na Odontologia, principalmente na parte proteômica. Grande parte dos trabalhos envolve a utilização de arrays de DNA, principalmente na pesquisa clínica (NAZMUL-HOSSAIN et al., 2008).

A utilização de marcadores séricos é uma prática bastante difundida na Medicina no processo de estabelecimento do diagnóstico das patologias, porém, ainda incipiente na Odontologia. A busca por biomarcadores moleculares correlacionados com doença periodontal pode permitir diagnósticos rápidos e precisos, monitorização dinâmica da atividade da doença e, potencialmente, um tratamento mais eficaz (HERR et al., 2007).

Dosagens de IL-1 $\beta$ , uma citocina associada à perda óssea no soro de ratos foram encontradas mais elevadas no grupo que recebeu alendronato ou uma combinação de alendronato e doxiciclina, enquanto que os níveis de osteocalcina, um marcador de ganho ósseo, também estava elevada, dados que revelam que os níveis séricos elevados da IL-1 $\beta$  não interferem no efeito protetor do alendronato. Fatos como este, sugerem atenção na interpretação dos resultados de biomarcadores quando em associação (BUDUNELI et al., 2005).

Em estudo clínico com pacientes portadores de periodontite agressiva, níveis séricos elevados de proteína C-reativa e IL-6 se mostraram maiores do que naqueles indivíduos saudáveis (SUN et al., 2009). Em outro estudo, os níveis séricos de IL-6 elevaram-se após 60 minutos do início de raspagem radicular subgingival enquanto que os níveis de TNF $\alpha$  elevaram-se após 120 minutos do mesmo procedimento, demonstrando que a manipulação dos tecidos periodontais pode alterar dosagens séricas de biomarcadores (IDE et al., 2004).

A perda óssea na doença periodontal ocorre em surtos, ou seja, a doença manifesta-se em episódios de atividade. Os recursos atuais do diagnóstico baseiam-se muito mais na história passada da doença (profundidade de sondagem, exames radiográficos, índice de sangramento, etc.) quando a perda óssea já aconteceu. Diversos meios para avaliar essa atividade já foram utilizados, envolvendo principalmente marcadores originados no fluido crevicular e na saliva. Embora com resultados promissores nenhuns desses testes vêm sendo utilizados rotineiramente (OZMERIC, 2004). Grande parte dessa dificuldade vem da carência de uma metodologia simplificada na coleta (principalmente do fluido crevicular), e de uma relação custo-eficácia compatível que possa ser incorporada à clínica para auxílio no

diagnóstico da doença periodontal. Daí a importância da busca por marcadores séricos que possam indicar atividade da doença periodontal.

Marcadores séricos de perda óssea são amplamente utilizados na clínica médica em patologias como a osteoporose, porém no diagnóstico e monitorização da doença periodontal o seu uso é limitado, muito provavelmente por se tratar de marcadores de perda óssea com vários fatores esqueléticos de confundimento sem uma especificidade quanto ao processo ósseo alveolar. Este biomarcadores são: hidroxiprolina, glicosídeo de hidroxilisina, N-Telopeptídeo de ligação interfibras colágenas (NTx), fosfatase ácido resistente ao tartarato e sialoproteína óssea (McCAULEY, NOHTCU, 2002).

Ainda com relação ao perfil de segurança da acetazolamida, a mesma foi bem tolerada na dose de 25 mg/Kg sem promover lesão dos órgãos estudados, nem promover perda de peso apesar do efeito diurético esperado. A perda de peso inicial pode ser atribuída à indução cirúrgica da ligadura, o que promove trauma bucal e dificuldade de alimentação nas primeiras 24 horas do pós-operatório.

A acetazolamida tem grande afinidade pelos eritrócitos e discrasias sanguíneas podem acontecer com o uso crônico. A enzima anidrase carbônica é a responsável pela troca gasosa dos eritrócitos.

As doses analisadas quanto aos parâmetros de segurança parecem estar dentro dos limites do aceitável com poucas alterações significativas. Uma das alterações notadas foi à redução da hemoglobina, porém como no grupo veículo também ocorreu, não podemos associar diretamente a acetazolamida. As discrasias sanguíneas associadas raramente ao uso de acetazolamida são a trombocitopenia e a anemia aplástica (REISS, OLES, 1996).

Segundo Filippi et al., (2002), a acetazolamida pode provocar acidose láctica sintomática e supressão da medula óssea por mecanismo não conhecido, porém reversível. Estes efeitos podem ocorrer nos pacientes idosos, na insuficiência renal, na insuficiência hepática, no diabetes mellitus e no recém nascido.

Nossos resultados tanto na histopatologia hepática, como nas dosagens de transaminases, demonstraram ser bem tolerada a dose de 25 mg/Kg, sem sinais de toxicidade aguda.

Em um seguimento a longo prazo, perfazendo até 3,8 anos em tratamento da uveíte crônica, acetazolamida foi utilizada em monoterapia nas doses de 125, 250 e 500 mg/dia em 48 pacientes. Estas doses foram bem toleradas, sendo os principais efeitos adversos a parestesia de extremidades em 11 casos, queixas gastrointestinais em 6 casos, fadiga crônica combinada com perda de peso em 4 casos, poliúria em 1 caso e RASH em 1 caso. Sendo que quando foi reduzida a dose a menos de 500 mg esses efeitos desapareceram (SCHILLING et al., 2005).

Quando acetazolamida foi administrada em 75 pacientes na dose de 1000 mg/dia associada a timolol gel, durante uma semana, no tratamento de glaucoma de ângulo aberto ou hipertensão ocular, 75% dos pacientes relataram efeitos adversos, sendo que 53 % desses estavam relacionados à inibição da anidrase carbônica (STEWART et al., 2002).

As transaminases, (TGP ou ALT e TGO ou AST), são enzimas encontradas em vários órgãos e tecidos, incluindo fígado, coração, musculatura esquelética, eritrócitos e outros. A relação TGO/TGP quando inferior a 1 relata hepatites virais agudas, enquanto nas hepatopatias crônicas os valores de TGO permanecem superiores aos de TGP (DOLES, 2008). Nos casos de hepatite aguda ocorre um aumento muito significativo no sangue dessas enzimas, chegando a ser mais de dez vezes o limite superior do normal e nas agressões crônicas essa alteração, em geral, chega a ser duas a cinco vezes o limite superior ao normal.

A Gama-glutamilttransferase (GGT) é uma enzima microsomal que está amplamente distribuída nos tecidos incluindo o fígado e os túbulos renais. A atividade da GGT no plasma está aumentada sempre que há colestase. Ela mede a capacidade excretora do fígado. Sua elevação é a alteração laboratorial mais freqüente nas doenças hepatobiliares (mais de 90% dos casos), pois é observada não apenas nas colestases com tradução histológica, mas também nas lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas. Dosagens seriadas são imprescindíveis no

acompanhamento de agressões hepáticas, para definir a evolução no sentido da cura (SANTOS, 2003).

Diante dos nossos achados vale salientar a necessidade de novas pesquisas sobre a relação entre a acetazolamida e a doença periodontal experimental e futuramente a periodontite humana. Este trabalho é pioneiro no uso deste fármaco e investigações mais aprofundadas sobre o papel da acetazolamida no papel protetor de reabsorção óssea pode ser investigado em meios de cultura, bem como, qual o papel da IL-4 e do CNTF no reparo do periodonto.

A tecnologia do microarray facilitará o entendimento dos fenômenos biológicos e reduzirá custos operacionais quando vários biomarcadores forem avaliados tanto da DP como de outras doenças bucais.

Neste modelo de periodontite induzida podemos concluir que a acetazolamida pode proteger o periodonto da reabsorção óssea induzida por ligadura em ratos, bem como pode estar associada à elevação de níveis séricos de mediadores envolvidos com o reparo tecidual como IL-4 e CNTF, sendo bem tolerada na dose de 25 mg/Kg, além disso a acetazolamida não interfere na migração de leucócitos na periodontite experimental. Observou-se ainda que a DP estimula uma leucocitose com neutrofilia mantida após 11 dias. A acetazolamida, bem como a DP pode estar associada a redução da hemoglobina.

---

**CONCLUSÃO**

## **7.0 CONCLUSÃO**

A acetazolamida (25 e 75 mg/Kg) é eficaz e segura (25 mg/Kg) no tratamento da periodontite experimental em ratos.

---

---

**REFERÊNCIAS CONSULTADAS**

## 8.0 REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. AIRILA-MÅNSSON, S.; SÖDER, B.; KARI, K.; MEURMAN, J.H. Influence of combinations of bacteria on the levels of prostaglandin E<sub>2</sub>, Interleukin-1B, and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid and on the severity of periodontal disease. **J. Periodontol**, v.77, p.1025-1231, 2006.
2. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY - AAP. 1999 International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v.4, n. p.457-70, 1999.
3. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY - AAP. 2003. Diagnosis of periodontal diseases. **J Periodontol**, v.74, p. 1237-47, 2003.
4. ARMITAGE, G.C.; ROBERTSON, P.B. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. **J Am Dent Assoc**, v.140, Suppl 1, p.36S-43S, Sep. 2009.
5. ASARI, M.; SASAKI, K.; KANO, Y.; NISHITA, T. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozymes I, II and III in the bovine salivary glands and stomach. **Arch Histol Cytol**, v.52, n.4, p.337-44, Oct. 1989.
6. ASSUMA, R. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J Immunol**, v.160, n.1, p.403-409, 1998.
7. AXELSSON, P.; LINDHE, J.; NYSTROM, B. On the prevention of caries and periodontal disease: Results of a 15-year longitudinal study in adults. **J Clin Periodontol**, v.18, p.182-9, 1991.
8. AZOUBEL, M.C.; MENEZES, A.M.; BEZERRA, D.; ORIÁ, R.B.; RIBEIRO. R.A.; BRITO, G.A. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Braz J Med Biol Res**, v.40, n.1, p.117-25, Jan. 2007.
9. BAK, E.J.; PARK, H.G.; KIM, M.; KIM, S.W.; KIM, S.; CHOI, S.H.; CHA, J.H.; YOO, Y.J. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. **J Periodontol**, v.81, n.3, p.412-429, Mar, 2010.
10. BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res**, v.35, n.5, p.613-616, May, 2002.
11. BHATTACHARYA, M., ALPER S. I. *in* GOLAN, D.E. et al., **Principios de Farmacologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.329.
12. BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J Periodontal Res**, v.28, n.6-2, p.500-510, Nov, 1993.
13. BISKOBING, D.M.; FAN, D.; FAN, X.; RUBIN, J. Induction of carbonic anhydrase II expression in osteoclast progenitors requires physical contact with stromal cells. **Endocrinology**, v.138, n.11, p.4852-7, Nov. 1997.

14. BLAIR, H.C.; ATHANASOU, N.A. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. **Histol Histopathol**, v.19, n.1, p.189-99, Jan. 2004.
15. BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.423, n.6937, p.337-342, May-15, 2003.
16. BREIVIK, T., GUNDERSEN, Y., FONNUM, F., VAAGENES, P., OPSTAD, P.K. Chronic glycine treatment inhibits ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **J Periodont Res**, v.40, p. 43-47, 2005.
17. BUDUNELI, E.; BUDUNELI, N.; VARDAR-SENGÜL, S.; KARDESLER, L.; ATILLA, G.; LAPPIN, D.; KINANE, D.F. Systemic low-dose doxycycline and alendronate administration and serum interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein levels in rats. **J Periodontol**, v.76, n.11, p.1927-1933, Nov, 2005.
18. BUHLIN, K.; HULTIN, M.; NORDERYD, O.; PERSSON, L.; POCKLEY, A.G.; RABE, P.; KLINGE, B.; GUSTAFSSON, A. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.36, n.7, p.541-549, jul, 2009.
19. CARTA, F.; POTHEN, B.; MARESCA, A.; TIWARI, M.; SINGH, V.; SUPURAN, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of cytosolic carbonic anhydrase isozymes II and VII with simple aromatic sulfonamides and some azo dyes. **Chem Biol Drug Des**, v.74, n.2, p.196-202, Ago. 2009.
20. CHESROWN, S.E.; MONNIER, J.; VISNER, G.; NICK, H.S. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF-gamma, TGF-beta, and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v.200, n.1, p.126-134, Apr-15, 1994.
21. CIANCIO, S.; ASHLEY, R. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. **Adv Dent Res**, v.12, n.2, p.27-31, 1998.
22. CLAFFEY, N.; EGELBERG, J. Clinical indicators of probing attachment loss following initial periodontal treatment in advanced periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v.22, p.690-696, 1995.
23. CLARK, W.B.; LÖE, H. Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 2, p. 72-82, 1993.
24. COBB, C.M. Non-surgical pocket therapy: mechanical. **J Periodontol Ann**, v.1, p.443-90, 1996.
25. COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol**, v.79, n.8 suppl, p.1569-76, Ago, 2008.
26. COHEN, W.; MEALEY, B.L. **Medicina Periodontal**, São Paulo: Santos Ltda., 2002. cap.1, p.1-10.
27. DAVID, J.P.; RINCON, M.; NEFF, L.; HORNE, W.C.; BARON, R. Carbonic anhydrase II is an AP-1 target gene in osteoclasts. **J Cell Physiol**, v. 188, n.1, p.89-97, jul. 2001.

28. de FELIPPE JUNIOR, J. Câncer e acetazolamida: inibe a proliferação celular maligna, aumenta a apoptose, inibe a neoangiogenese e diminui a invasão tumoral e as metástases. **Portal educação**, Disponível em: <http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/3895/cancer-e-acetazolamida-inibe-a-proliferao-celular-maligna-aumenta-a-apoptose-inibe-a-neoangiogenese-e-diminui-a-invasao-tumoral-e-as-metastases>, 2008 . Acesso em 05 de janeiro de 2010.
29. de LIMA, V.; BEZERRA, M.M.; ALENCAR, V.B.M.; VIDAL, F.D.P.; ROCHA, F.A.C.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci**, v.108, n.2, p.123–29, 2000.
30. de LIMA, V.; VIDAL, F.D.P.; ROCHA, F.A.C.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A. Effects of TNF- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J Periodontol**, v.75, n.1, p.156–162, 2004.
31. DELIMA, A.J.; OATES, T.; ASSUMA, R.; SCHWARTZ, Z.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.28, n.3, p.233-240, Mar, 2001.
32. Di FIORE, A.; MONTI, S.M.; HILVO, M.; PARKKILA, S.; ROMANO, V.; SCALONI, A.; PEDONE, C.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T.; DE SIMONE, G. Crystal structure of human carbonic anhydrase XIII and its complex with the inhibitor acetazolamide. **Proteins**, v.74, n.1, p.164-175, Jan, 2009.
33. DOLES, 2008. Disponível em: <http://www.doles.com.br/prods.html> Acessado em: 3 de Agosto de 2009.
34. DUARTE, P.M.; DE ASSIS, D.R.; CASATI, M.Z.; SALLUM, A.W.; SALLUM, E.A.; NOCITI, F.H. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. **J Periodontol**, v.75, n.9, p.1196-1202, Sep, 2004.
35. FELIX, R.; HOFSTETTER, W.; CECCHINI, M.G. Recent developments in the understanding of the pathophysiology of osteopetrosis. **Eur J Endocrinol**, v.134, n.2, p.143-56, Feb, 1996.
36. FILIPPI, L.; BAGNOLI, F.; MARGOLICCI, M.; ZAMMARCHI, E.; TRONCHIN, M.; RUBALTELLI, F.F. Pathogenic mechanism, prophylaxis, and therapy of symptomatic acidosis induced by acetazolamide. **J Investig Med**, v.50, n.2, p. 125-132, Mar, 2002.
37. FISHER, M.A.; TAYLOR, G.W.; PAPAPANOU, P.N.; RAHMAN, M.; DEBANNE, S.M. Clinical and serologic markers of periodontal infection and chronic kidney disease. **J Periodontol**, v.79, n.9, p.1670-1678, Sep, 2008.
38. FU, Q.; JILKA, R.L.; MANOLAGAS, S.C.; O'BRIEN, C. A.; Parathyroid Hormone Stimulates Receptor Activator of NF  $\kappa$ B Ligand and Inhibits Osteoprotegerin Expression via Protein Kinase A Activation of cAMP-response Element-binding Protein, **J Biol Chem**, v. 277, n. 50, p. 48868–48875, Dec, 2002.
39. FUJISAKI, K.; TANABE, N.; SUZUKI, N.; KAWATO, T.; TAKEICHI, O.; TSUZUKIBASHI, O.; MAKIMURA, M.; ITO, K.; MAENO, M. Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix

metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. **Life Sci**, v.80, n.14, p.1311-8, Mar-13. 2007.

40. GAMBHIR, K.K.; ORNASIR, J.; HEADINGS, V.; BONAR, A. Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients. **Biochem Genet**, v.45, n.5-6, p.431-9, Jun. 2007.

41. GAPSKI, R.; BARR, J.L.; SARMENT, D.P.; LAYHER, M.G.; SOCRANSKY, S.S.; GIANNOBILE, W.V. Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. **J Periodontol**, v.75, n.3, p.441-452, Mar, 2004.

42. GIANNOBILE, W.V. Host-response therapeutics for periodontal diseases. **J Periodontol**, v.79, n.8 Suppl, p.1592-600, Ago. 2008.

43. GONÇALVES, P.F. et al., Patogênese da doença periodontal. *Em: Periodontia: a atualização clínica baseada em evidências científicas*. São Paulo: Artes Médicas, 2005. v.1, p.42-49, 561p.

44. GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v.74, n.3, p.391-401, Mar, 2003.

45. GRAVES, D.T.; FINE, D.; TENG, Y.T.; Van DYKE, T.E.; HAJISHENGALLIS, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v.35, n.2, p.89-105, Feb, 2008.

46. GREENE, I.M.; KENNY, A.D. Determination of acetazolamide in human serum by enzymatic assay. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.28, n.3, p.159-66, Nov. 1992.

47. GÜLLÜ, C.; OZMERIC, N.; TOKMAN, B.; ELGÜN, S.; BALOS, K. Effectiveness of scaling and root planning versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol Res**, v.40, n.2, p.168-175, Apr, 2005.

48. HASSUMI, M.Y.; SILVA-FILHO, V.J.; CAMPOS-JÚNIOR, J.C.; VIEIRA, S.M.; CUNHA, F.Q.; ALVES, P.M.; ALVES, J.B.; KAWAI, T.; GONÇALVES, R.B.; NAPIMOGA, M.H. PPAR-gamma agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. **Int Immunopharmacol**, v.9, n.10, p.1150-8, Sep. 2009.

49. HECK, R.W.; BORIACK-SJODIN, P.A.; QIAN, M.; TU, C.; CHRISTIANSON, D.W.; LAIPIS, P.J.; SILVERMAN, D.N. Structure-based design of an intramolecular proton transfer site in murine carbonic anhydrase V. **Biochemistry**, v.35, n.36, p.11605-11, Sep. 1996.

50. HENRY, R.P.; SWENSON, E.R. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. **Respir Physiol**, v.121, n.1, p.1-12, Jun. 2000.

51. HERR, A.E.; HATCH, A.V.; THROCKMORTON, D.J.; TRAN, H.M.; BRENNAN, J.S.; GIANNOBILE, W.V.; SINGH, A.K. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.13, p.5268-73, Mar-27. 2007.

52. HERZBERG, M.C.; WEYER, M.W. Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases. **Ann Periodontol**, v.3, n.1, p.151-160, Jul, 1998.
53. HIGASHI, Y.; GOTO, C.; HIDAKA, T.; SOGA, J.; NAKAMURA, S.; FUJII, Y.; HATA, T.; IDEI, N.; FUJIMURA, N.; CHAYAMA, K.; KIHARA, Y.; TAGUCHI, A. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.206, n.2, p.604-610, Oct 2009.
54. HOLZHAUSEN, M.; ROSSA JÚNIOR, C.; MARCANTONIO JÚNIOR, E.; NASSAR, P.O.; SPOLIDÓRIO, D.M.; SPOLIDÓRIO, L.C. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.73, n.9, p.1030-1036, Sep, 2002.
55. IDE, M.; JAGDEV, D.; COWARD, P.Y.; CROOK, M.; BARCLAY, G.R.; WILSON, R.F. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. **J Periodontol**, v.75, n.3, p.420-428, Mar, 2004.
56. INOUE, M.; YOSHIDA, H.; AKISAKA, T. Visualization of acidic compartments in cultured osteoclasts by use of an acidotrophic amine as a marker for low pH. **Cell Tissue Res**, v. 298, p.527-37, 1999.
57. JEFFCOAT, M.K.; PAGE, R.; REDDY, M.; WANNAWISUTE, A.; WAITE, P.; PALCANIS, K.; COGEN, R.; WILLIAMS, R.C.; BASCH, C. Use of digital radiography to demonstrate the potential of naproxen as an adjunct in the treatment of rapidly progressive periodontitis. **J Periodontal Res**, v.26, n.5, p.415-421, Sep, 1991.
58. JEFFCOAT, M.K.; REDDY, M.S.; HAIGH, S.; BUCHANAN, W.; DOYLE, M.J.; MEREDITH, M.P.; NELSON, S.L.; GOODALE, M.B.; WEHMEYER, K.R. A comparison of topical ketorolac, systemic flurbiprofen, and placebo for the inhibition of bone loss in adult periodontitis. **J Periodontol**, v.66, n.5, p.329-338, May, 1995.
59. JIN, Q.; CIRELLI, J.A.; PARK, C.H.; SUGAI, J.V.; TABA, M.; KOSTENUIK, P.J.; GIANNOBILE, W.V. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **J Periodontol**, v.78, n.7, p.1300-8, Jul. 2007.
60. JOYCE, P.W.; MILLS, K.B. Comparison of the effect of acetazolamide tablets and sustets on diurnal intraocular pressure in patients with chronic simple glaucoma. **Br J Ophthalmol**, v.74, n.7, p.413-16, 1990.
61. JOYCE, P.W.; MILLS, K.B.; RICHARDSON, T.; MAWER, G.E. Equivalence of conventional and sustained release oral dosage formulations of acetazolamide in primary open angle glaucoma. **Br J Clin Pharmacol**, v.27, n.5, p.597-606, 1989.
62. KANER, D.; BERNIMOULIN, J.P.; HOPFENMÜLLER, W.; KLEBER, B.M.; FRIEDMANN, A. Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicilin / metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v.34, n.10, p.880-891, 2007.
63. KARTSOGIANNIS, V.; N.G. K.W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. **Mol Cell Endocrinol**, v.228, n.1-2, p.79-102, Dec-30, 2004.

64. KATAGIRI, M.; OGASAWARA, T.; HOSHI, K.; CHIKAZU, D.; KIMOTO, A.; NOGUCHI, M.; SASAMATA, M.; HARADA, S.; AKAMA, H.; TAZAKI, H.; CHUNG, U.; TAKATO, T.; NAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, H. Suppression of adjuvant-induced arthritic bone destruction by cyclooxygenase-2 selective agents with and without Inhibitory potency against carbonic anhydrase II. **J Bone Miner Res**, v. 21, n.2, p.219-27, 2006.
65. KHOSLA S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v.142, n.12, p.5050-5, Dec. 2001.
66. KRUSTRUP, U.; ERIK PETERSEN, P. Periodontal conditions in 35-44 and 65-74 year old adults in Denmark, **Acta Oonto Scand**, v.64, n.2, p.65-73, Apr, 2006.
67. KUBOTA, T; NOMURA, IT; TAKAHASHI, T; HARA I, K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue, **Archs oral Biol.** v. 41, n.3, p. 253 262, 1996.
68. KUHR, A.; POPA-WAGNER, A.; SCHMOLL, H.; SCHWAHN, C.; KOCHER, T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodont Res**, v.39, p.101-06, 2004.
69. KURIHARA, H.; SHINOHARA, H.; YOSHINO, H.; TAKEDA, K.; SHIBA, H. Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissues. **J Periodontol**, v.74, n.1, p.76-84, 2003.
70. LAMSTER, I.B. The host response in gingival crevicular fluid: potential applications in periodontitis clinical trials. **J Periodontol**, v.63 (Suppl), p.1117-1123, 1992.
71. LANE, N.; ARMITAGE, G.C.; LOOMER, P.; HSIEH, S.; MAJUMDAR, S.; WANG, H.Y.; JEFFCOAT, M.; MUNOZ, T. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. **J Periodontol**, v.76, .7, p.1113-22, 2005.
72. LEHENKARI, P.; HENTUNEN, T.A.; LAITALA-LEINONEN, T.; TUUKKANEN, J.; VÄÄNÄNEN, H.K. Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>. **Exp Cell Res**, v.242, p.128-137, 1998.
73. LEITÃO, R.F.; RIBEIRO, R.A.; CHAVES, H.V.; ROCHA, F.A.; LIMA, V.; BRITO, G.A. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.76, n.6, p.956-63, Jun. 2005.
74. LINDHE, J.; KARRING, T. A anatomia do periodonto. *In*: LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap.1, p.1-42.
75. LIU, D.; YAO, S.; WISE, G.E. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. **Eur J Oral Sci**, v.14, n.1, p.42-9, Feb. 2006.
76. LÖE, H.; ANERUD, A.; BOYSEN, H.; MORRISON, E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **J Clin Periodontol**, v.13, n.5, p.431-45, May. 1986.

77. LOMRI, A.; BARON, R. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 regulates the transcription of carbonic anhydrase II mRNA in avian myelomonocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.10, p.4688-92, May-15, 1992.
78. LOPES, A.A.; MARTINELLI, R. *in* SILVA, P. **Farmacologia**. 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.720.
79. MACNEIL, R.L.; D'ERRICO, J.; STRAYHORN, C.; PICKRUM, H.; SOMERMAN, M.J. Agents with periodontal regenerative potential regulate cell-mediated collagen lattice contraction in vitro. **J Dent Res**, v.75, p.903-911, 1996.
80. MARCACCINI, A.M.; NOVAES, A.B.; MESCHIARI, C.A.; SOUZA, S.L.; PALIOTO, D.B.; SORGI, C.A.; FACCIOLO, L.H.; TANUS-SANTOS, J.E.; GERLACH, R.F. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. **Clin Chim Acta**, v.409, n.1-2, p.117-122, Nov, 2009.
81. MATSUMOTO, S.; IKEDA, M.; NISHIKAWA, T.; YOSHIDA, S.; KADOI, J.; TANIMOTO, T.; SAIKI, C.; TAKEDA, M. Effects of acetazolamide and 4-aminopyridine on the responses of deflationary slowly adapting pulmonary stretch receptors to CO2 inhalation in the rat. **Life Sci**, v.72, p.1757-71, 2003.
82. McCAULEY, L.K.; NOHUTCU, R.M.. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol**, v.73, n.11, p.1377-1391, Nov, 2002.
83. MENEZES, A.M.; ROCHA, F.A.; CHAVES, H.V.; CARVALHO, C.B.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.76, n.11, p.1901-09, 2005.
84. MORI, G.G.; GARCIA, R.B.; GOMES DE MORAES, I. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of solution of acetazolamide as an intracanal therapeutic agent in late reimplanted rat teeth. **Dent Traumatol**, v.22, n.1, p.36-40, 2006.
85. MORI, S.; KOU, I.; SATO, H.; EMI, M.; ITO, H.; HOSOI, T.; IKEGAWA, S. Nucleotide variations in genes encoding carbonic anhydrase 8 and 10 associated with femoral bone mineral density in Japanese female with osteoporosis. **J Bone Miner Metab**, v.27, n.2, p.213-6, 2009.
86. NAZMUL-HOSSAIN, N.A.; PATEL, K.J.; RHODUS, N.L.; MOSER, K.L. Microarrays: applications in dental research. **Oral Disease**, v.14, p.25-9, 2008.
87. NISHIMORI, I.; MINAKUCHI, T.; ONISHI, S.; VULLO, D.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization, and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. **J Med Chem**, v.50, n.2, p.381-388, Jan-25, 2007.
88. NOGUEIRA-FILHO, G.da R.; ROSA, B.T.; CÉSAR-NETO, J.B.; TUNES, R.S.; TUNES, U.da,R. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. **J Periodontol**, v.78, n.4, p.730-735, apr, 2007.

89. OFFENBACHER, S.; BECK, J.D.; MOSS, K.; MENDOZA, L.; PAQUETTE, D.W.; BARROW, D.A.; COUPER, D.J.; STEWART, D.D.; FALKNER, K.L.; GRAHAM, S.P.; GROSSI, S.; GUNSOLLEY, J.C.; MADDEN, T.; MAUPOME, G.; TREVISAN, M.; VAN DYKE, T.E.; GENCO, R.J. Results from the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: a pilot multicentre, randomized, controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. **J Periodontol**, v.80, n.2, p.190-201, Feb, 2009.
90. OGASAWARA, T.; YOSHIMINE, Y.; KIYOSHIMA, T.; KOBAYASHI, I.; MATSUO, K.; AKAMINE, A.; SAKAI, H. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. **J Periodontal Res**, v.39, n.1, p.42-9, Feb. 2004.
91. OHBA, Y.; OHBA, T.; SUMITANI, K.; TAGAMI-KONDOH, K.; HIURA, K.; MIKI, Y.; KAKEGAWA, H.; TAKANO-YAMAMOTO, T.; KATUNUMA, N. Inhibitory mechanisms of H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 and carbonic anhydrase II inhibitor acetazolamide on experimental bone resorption. **FEBS Lett**, v.387, p.175-178, 1996.
92. ORINGER, R.J. - American Academy of Periodontology (AAP) Modulation of the host response in periodontal therapy. **J Periodontol**, v.73, n.4, p.460-470, Apr, 2002.
93. OZMERIC, N. Advances in periodontal disease markers. **Clin Chim Acta**, v.343, n.1-2, p.1-16, May. 2004.
94. PALMQVIST, P.; LUNDBERG, P.; PERSSON, E.; JOHANSSON, A.; LUNDGREN, I.; LIE, A.; CONAWAY, H.H.; LERNER, U.H. Inhibition of Hormone and Cytokine-stimulated Osteoclastogenesis and Bone Resorption by Interleukin-4 and Interleukin-13 Is Associated with Increased osteoprotegerin and Decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent Pathway. **J Biol Chem**, v.281, n.5, p.2414-29, 2006.
95. PIHLSTROM, B.L.; MICHALOWICZ, B.S.; JOHNSON, N.W. Periodontal diseases. **Lancet**, v.366, n.9499, p.1809-1820, Nov-19, 2005.
96. POLAK, D.; WILENSKY, A.; SHAPIRA, L.; HALABI, A.; GOLDSTEIN, D.; WEISS, E.I.; HOURI-HADDAD, Y. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. **J Clin Periodontol**, v.36, n.5, p.406-410, May, 2009.
97. POULIOT, M.; CLISH, C.B.; PETASIS, N.A.; VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. **Biochemistry**, v.39, n.16, p.4761-4768, Apr-25, 2000.
98. PRADEEP, A.R.; ROOPA, Y.; SWATI, P.P. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. **J Periodont Res**, v.43, p.712-16, 2008.
99. RADHAKRISHNAN, R.; SLUKA, K.A. Acetazolamide, a Carbonic Anhydrase Inhibitor, Reverses Inflammation-Induced Thermal hyperalgesia in Rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.313, n.2, p.921-927. 2005.

100. RAMALHO, A.C.R.; LAZARETTI-CASTRO, M.; COHEN-SOLAL, M.E.; VERNEJOUL, M.C. de. Porque estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral ossea? mecanismos de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso / Why estrogen and raloxifene improve the bone mineral density? action mechanisms of estrogen and of a selective estrogen receptor modulator (SERM) in bone. **Arq bras endocrinol metab**, v. 44, n.6, p.471-82, dec. 2000.
101. RAMAMURTHY, N.S.; RIFKIN, B.R.; GREENWALD, R.A.; XU, J.W.; LIU, Y.; TURNER, G.; GOLUB, L.M.; VERNILLO, A.T. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. **J Periodontol**, v.73, n.7, p.726-34, jul. 2002.
102. RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; QUILES, J.L.; BATTINO, M.; GRANADOS, S.; MORILLO, J.M.; BOMPADRE, S.; NEWMAN, H.N.; BULLON, P. Periodontitis is associated with altered plasma fatty acids and cardiovascular risk markers. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.20, n.2, p.133-139, Feb, 2010.
103. RAMSEIER, C.A.; KINNEY, J.S.; HERR, A.E.; BRAUN, T.; SUGAI, J.V.; SHELBURNE, C.A.; RAYBURN, L.A.; TRAN, H.M.; SINGH, A.K.; GIANNOBILE, W.V. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. **J Periodontol**, v.80, n.3, p.436-446, Mar, 2009.
104. RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M.; MOORE, P.M. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.
105. REDDY, M.S.; GEURS, N.C.; GUNSOLLEY, J.C. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. **Ann Periodontol**, v.8, n.1, p.12-37, Dec, 2003.
106. REDDY, M.S.; PALCANIS, K.G.; BARNETT, M.L.; HAIGH, S.; CHARLES, C.H.; JEFFCOAT, M.K. Efficacy of meclofenamate sodium (Meclomen) in the treatment of rapidly progressive periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.20, p.635-640, 1993.
107. REISS, W.G.; OLES, K.S. Acetazolamide in the treatment of seizures. **Ann Pharmacother**, v.30, n.5, p.514-9, May. 1996.
108. RESOR, S.R.; RESOR, L.D. Chronic acetazolamide monotherapy in the treatment of juvenile myoclonic epilepsy. **Neurology**, v. 40, n.11, p.1677-1681, Nov, 1990.
109. RIZZUTTI, S.; NISHIYAMA, A.N.; MUSZKAT, M. Campos, C. J.R. de. Epilepsias – Tratamentos Alternativos. **Rev Neurocienc**, v. 7, n.1, p.32-38, 1999.
110. ROCHA, M.L.; MALACARA, J.M.; SÁNCHEZ-MARIN, F.J.; VAZQUEZ DE LA TORRE, C.J.; FAJARDO, M.E. Effect of alendronate on periodontal disease in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled trial. **J Periodontol**, v.75, n.12, p.1579-1585, Dec, 2004.
111. RUSSELL, R.G.; WATTS, N.B.; EBETINO, F.H.; ROGERS, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int**, v.19, n.6, p.733-759, Jun, 2008.

112. SALVI, G.E.; LANG, N.P. Host response modulation in the management of periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v.32, n. Suppl 6, p.108-29, 2005.
113. SAMPAIO, J.E.C. et al., O periodonto – anatomia e histofisiologia. *Em*: PAIVA, J.S.; ALMEIDA, R.V. **Periodontia: a atualização clínica baseada em evidências científicas**. São Paulo: Artes Médicas, 2005, cap.1, p.1-21.
114. SANTOS, M. M. A; **Provas de função e lesão hepática, 2003**. Disponível em: <[http://www.damedpel.com/CDD/5o\\_6oAno/CLINICA/Internato%20I/Discussao%20-%20Dr.%20Gastal/DD.REVIS%C3O%202%20%20Prova\\_funcao\\_hepatica%20Medstudents%2B%2B%2B.pdf](http://www.damedpel.com/CDD/5o_6oAno/CLINICA/Internato%20I/Discussao%20-%20Dr.%20Gastal/DD.REVIS%C3O%202%20%20Prova_funcao_hepatica%20Medstudents%2B%2B%2B.pdf)>. Acesso em: 10 Mayo 2008.
115. SARIOLA, H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. **Cell Mol Life Sci**, v.58, n.8, p.1061-6, jul. 2001.
116. SCANNAPIECO, F. A. Inflamação periodontal: da gengivite à doença sistêmica. **Compendium**, v.25, n.7 (Supl 1), jul, 2004.
117. SCHILLING, H.; HEILIGENHAUS, A.; LAUBE, T.; BORNFIELD, N.; JURKLIES, B. Long-term effect of acetazolamide treatment of patients with uveitic chronic cystoid macular edema is limited by persisting inflammation. **Retina**, v.25,p.182-88, 2005.
118. SCHWARTZ, G.J.; BRION, L.P.; COREY, H.E.; DORFMAN, H.D. Case report 668. Carbonic anhydrase II deficiency syndrome (osteopetrosis associated with renal tubular acidosis and cerebral calcification). **Skeletal Radiol**, v.20, n.6, p.447-452, 1991.
119. SERHAN, C.N., Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.73, n.3-4, p.141-162, 2005.
120. SERHAN, C.N.; JAIN, A.; MARLEAU, S.; CLISH, C.; KANTARCI, A.; BEHBEHANI, B.; COLGAN, S.P.; STAHL, G.L.; MERCHED, A.; PETASIS, N.A.; CHAN, L.; VAN DYKE, T.E. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. **J Immunol**, v.171, n.12, p.6856-6865, dec-15, 2003.
121. SETO, H.; TOBA, Y.; TAKADA, Y.; KAWAKAMI, H.; OHBA, H.; HAMA, H.; HORIBE, M.; NAGATA, T. Milk basic protein increases alveolar bone formation in rat experimental periodontitis. **J Periodontal Res**, v.42, n.1, p.85-89, Feb, 2007.
122. SIMONET, W.S.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; KELLEY, M.; CHANG, M.S.; LÜTHY, R.; NGUYEN, H.Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H.L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T.M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W.J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v.89, n.2, p.309-19, Apr-18. 1997.
123. SIQUEIRA Jr, J.F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p.154-57.

124. SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Rev Neurocienc**, v.15, n.3, p.226–233, 2007.
125. SONE, M.; SEI, H.; MORITA, Y.; OGURA, T.; SONE, S. The effects of acetazolamide on arterial pressure variability during REM sleep in the rat. **Physiol Behav**, v.63, n.2, p.213-8, Jan. 1998.
126. SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem Pharmacol**, v.51, n.4, p.383-394, Feb-23, 1996.
127. STEWART, W.C.; HALPER, L.K.; JOHNSON-PRATT, L.; POLIS, A.; HARTENBAUM, D. Tolerability and efficacy of dorzolamide versus acetazolamide added to timolol. **J Ocul Pharmacol Ther**, v.18, n.3, p.211-220, Jun, 2002.
128. SUDA, T., TAKAHASHI, N., MARTIN, T.J. Modulation of osteoclast differentiation. **Endoc Rev**, v.13, p.66-80, 1992.
129. SUN, X.J.; MENG, H.X.; SHI, D.; XU, L.; ZHANG, L.; CHEN, Z.B.; FENG, X.H.; LU, R.F.; REN, X.Y. Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. **J Periodontol Res**, v.44, n.3, p.311-316, Jun, 2009.
130. SWENSON, E.R. A comparative approach to carbonic anhydrase: the work of Thomas H. Maren. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v.136, n. 2, p.229-41, Oct. 2003.
131. TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; TANAKA, S.; MURAKAMI, H.; OWAN, I.; TAMURA, T.; SUDA, T. Postmitotic osteoclast precursors are mononuclear cells which express macrophage-associated phenotypes. **Dev Biol**, v.163, n.1, p.212-21, May. 1994.
132. TAKEDA, K.; SHIBA, H.; MIZUNO, N.; HASEGAWA, N.; MOURI, Y.; HIRACHI, A.; YOSHINO, H.; KAWAGUCHI, H.; KURIHARA, H. Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. **Tissue Eng**, v.11, n.9/10, p.1618-29, 2005.
133. TAUBMAN, M.A.; KAWAI, T.; HAN, X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. **J Clin Periodontol**, v.34, n.5, p.367-369, 2007.
134. TOKER, H.; OZDEMIR, H.; EREN, K.; OZER, H.; SAHIN, G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.80, n.4, p.672-8, Apr. 2009.
135. TOLAR, J.; TEITELBAUM, S. L.; ORCHARD, P. J. Osteopetrosis. **N Engl J Med**, v. 351, n. 351, p. 2839-49, Dec. 2004.
136. TONETTI, M.S. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. **J Clin Periodontol**, v.36 Suppl, n.10, p.15-19, Jul, 2009.
137. TONG, C.K.; BRION, L.P.; SUAREZ, C.; CHESLER, M. Interstitial carbonic anhydrase (CA) activity in brain is attributable to membrane-bound CA type IV. **J Neurosci**, v.20, n.22, p. 8247-53, Nov-15. 2000.

138. TRIPP, B.C.; BELL, C.B.; CRUZ, F.; KREBS, C.; FERRY, J.G. A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. **J Biol Chem**, v.279, n.8, p.6683-7, Feb-20. 2004.
139. TSUBOI, Y.; NAKANISHI, T.; TAKANO-YAMAMOTO, T.; MIYAMOTO, M.; YAMASHIRO, T.; TAKIGAWA, M. Mitogenic effects of neutrophins on a periodontal ligament cell line. **J Dent Res**, v. 80, n.3, p.881-6, Mar. 2001.
140. TUNES, U.R. et al.,Classificação das doenças periodontais. *Em*: PAIVA, J.S.; ALMEIDA, R.V. **Periodontia – a atualização clínica baseada em evidências científicas**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. cap.7, p.107-120.
141. UEDA, N.; NISHIHARA, T.; ISHIHARA, Y.; AMANO, K.; KUROYANAGI, T.; NOGUCHI, T. Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. **Oral Microbiol Immunol**, v.10, n.2, p.69-75, Sep. 1995.
142. WAHL, L.M.; CORCORAN, M.L. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. **J Periodontol**, v.64 (Suppl), p.467-473, 1993.
143. WEST, M.A.; LEMIEUR, T.L.; HACKAM, D.; BELLINGHAM, J.; CLAIRE, L.; RODRIGUEZ, J.L. Acetazolamide treatment prevents in vitro endotoxin-stimulated tumor necrosis factor release in mouse macrophages. **Shock**, v.10, n.6, p.436-441,dec, 1998.
144. WESTFELT, E.; NYMAN, S.; SOCRANSKY, S.; LINDHE, J. Significance of frequency of professional tooth cleaning for healing following periodontal surgery. **J Clin Periodontol**, v.10, p.148-56, 1983.
145. WETZEL, P.; SCHEIBE, R.J.; HELLMANN, B.; HALLERDEI, J.; SHAH, G.N.; WAHEED, A.; GROS, G.; SLY, W.S. Carbonic anhydrase XIV in skeletal muscle: subcellular localization and function from wild-type and knockout mice. **Am J Physiol Cell Physiol**,v. 293, n.1, p.C358-66, jul. 2007.
146. WILLIAMS, R.C.; BECK, J.D.; OFFENBACHER, S.N. The impact of new technologies to diagnose and treat periodontal disease: a look in the future. **J Clin Periodontol**, v.23, p.299-305, 1996.
147. XIANG, Y.; MA, B.; LI, T.; GAO, J.W.; YU, H.M.; LI, X.J. Acetazolamide inhibits aquaporin-1 protein expression and angiogenesis. **Acta Pharmacol Sin**, v.25, n.6, p.812-6, Jun. 2004.
148. YAMADA, A.; TAKAMI, M.; KAWAWA, T.; YASUHARA, R.; ZHAO, B.; MOCHIZUKI, A.; MIYAMOTO, Y.; ETO, T.; YASUDA, H.; NAKAMICHI, Y.; KIM, N.; KATAGIRI, T.; SUDA, T.; KAMIJO, R. Interleukin-4 inhibition of osteoclast differentiation is stronger than that of interleukin-13 and they are equivalent for induction of osteoprotegerin production from osteoblasts. **Immunology**, v.120,:573-79, 2007.
149. YASUDA H; SHIMA N; NAKAGAWA N; YAMAGUCHI K; KINOSAKI M; MOCHIZUKI S; TOMOYASU A; YANO K; GOTO M; MURAKAMI A; TSUDA E; MORINAGA T; HIGASHIO K; UDAGAWA N; TAKAHASHI N; SUDA T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor

and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.7, p.3597-602, Mar-31. 1998.

150. ZHANG, S.; LESKE, D.A.; LANIER, W.L.; BERKOWITZ, B.A.; HOLMES, J.M. Preretinal neovascularization associated with acetazolamide-induced systemic acidosis in the neonatal rat. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.42, n.5, p.1066-71, 2001.

151. ZHENG, M.H.; FAN, Y.; WYSOCKI, S.; WOOD, D.J.; PAPADIMITRIOU, J.M. Carbonic anhydrase II gene transcript in cultured osteoclasts from neonatal rats: effect of calcitonin. **Cell Tissue Res**, v.276, n.1, p.7-13, Apr. 1994.





# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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