

EFEITO DA DOXICICLINA E DA MINOCICLINA EM CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS HUMANAS: ESTUDOS *IN VITRO*

Maria João Coelho

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
mcoelho@ufp.pt

Cristina Pina

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
cpina@ufp.pt

Maria Pia Ferraz

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
mpferraz@ufp.pt

RESUMO

A doxiciclina e a minociclina são antibióticos utilizados para eliminar infecções que surgem após o processo cirúrgico e que parecem exercer uma acção benéfica sobre o metabolismo ósseo. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que baixas concentrações destes fármacos (1-5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) estimularam a proliferação das células de medula óssea humana. A exposição das células a 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de minociclina pareceu estimular o aparecimento de uma população celular mais proliferativa mas menos diferenciada. As concentrações de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de doxiciclina e 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de minociclina atrasaram a mineralização e concentrações mais elevadas destes antibióticos (25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de doxiciclina e 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de minociclina) foram citotóxicas.

PALAVRAS-CHAVE: culturas celulares; doxiciclina; minociclina; osteointegração.

ABSTRACT

Doxycycline and minocycline are antibiotics used to eliminate infections that arise after the surgical procedure that seem to have a beneficial action in bone metabolism. Results showed that low concentrations of these drugs (1-5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) stimulated human bone marrow cell proliferation. The exposure of cells to 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ minocycline stimulated the emergence of a more proliferative population but less differentiated. Concentrations of 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ doxycycline and 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ minocycline delayed the mineralization and higher concentrations of these antibiotics (25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ doxycycline and 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ minocycline) were cytotoxic.

KEY-WORDS: cell culture; doxycycline; minocycline; osteointegration.

1. INTRODUÇÃO

A perda óssea está associada ao processo de envelhecimento e pode também observar-se como resultado de variadas doenças metabólicas e de fracturas. Embora o tecido ósseo tenha uma considerável capacidade de regeneração ainda existem muitas situações em que este processo está dificultado, constituindo um problema em cirurgia óssea reconstrutiva. Neste contexto, o uso clínico de biomateriais osteocompatíveis e bioactivos tem importantes aplicações na reparação e reconstrução óssea.

O sucesso da utilização de um biomaterial pode estar comprometido por vários factores locais que dependem das características do material, da manipulação durante o processo cirúrgico e da resposta do hospedeiro ao material implantado. O aparecimento de um processo infeccioso local é um fenómeno relativamente frequente que pode comprometer a regeneração tecidular e a osteointegração do implante. Assim, é muitas vezes necessária a utilização sistémica de antibióticos para combater a infecção local. Dos vários antibióticos que são utilizados clinicamente, as tetraciclinas, nomeadamente a doxiciclina e a minociclina, apresentam um espectro antimicrobiano apropriado para o tratamento de infecções ósseas e uma eficácia clínica comprovada. Além do efeito anti-infeccioso, estes dois fármacos parecem exercer efeitos directos no microambiente ósseo que, aparentemente, se traduzem por um efeito benéfico nos processos de regeneração tecidular (Chaudhary e Avioli, 1994). A caracterização destes efeitos a nível celular reveste-se de particular interesse, pois que algumas das acções farmacológicas resultantes podem modular favoravelmente a resposta do hospedeiro contribuindo para o sucesso do processo de regeneração óssea (Seymour e Heasman, 1992).

As tetraciclinas foram introduzidas em 1948 como antibióticos de largo espectro, activas contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, aeróbias, anaeróbias facultativas e mesmo contra bactérias anaeróbias estritas (Sousa, 2005). Constituem uma família de antibióticos com um núcleo hidroxinaftaceno, formado por 4 anéis benzénicos fundidos (Sousa, 2005). As tetraciclinas inibem primariamente a síntese proteica bacteriana, actuando ao nível da subunidade 30S dos ribossomas. Têm sido usadas em medicina dentária, particularmente na terapêutica periodontal, em virtude das suas propriedades (Rifkin et al, 1994):

- 1) eficácia em suprimir organismos anaeróbios Gram-negativo que existem na placa subgingival;
- 2) capacidade de concentração no fluido crevicular gengival em níveis 5 a 10 vezes superiores aos encontrados no soro;
- 3) capacidade de ligação à superfície do dente, sendo libertadas lentamente sem perder a sua acção antimicrobiana. Esta característica permite prolongar a eficácia terapêutica durante algum tempo depois do fármaco deixar de ser administrado ao paciente.

Para além destas, estes antibióticos têm propriedades independentes da acção antimicrobiana que parecem modular a resposta do hospedeiro e que são, do ponto de vista terapêutico, vantajosas (Golub et al, 1991):

- 1) têm capacidade de promover a adesão de fibroblastos à superfície dos dentes, favorecendo a regeneração periodontal;
- 2) inibem directamente as enzimas colagenolíticas, diminuindo assim, a degradação do tecido conjuntivo. Esta propriedade não é exibida por mais nenhum outro grupo de antibióticos.

Foi na década de 80 que Golub e col. (Golub et al, 1991) verificaram que as tetraciclinas possuíam efeitos farmacológicos ao inibir a actividade das metaloproteínases, tal como a colagenase, e que esta acção não estava relacionada com a actividade antimicrobiana destes fármacos. A inibição que as tetraciclinas exercem sobre este grupo de enzimas deve-se à sua capacidade de ligação aos iões metálicos presentes nas metaloproteínases e que são necessários para a sua actividade de degradação da matriz. Assim, ao

inibirem directamente a acção da colagenase, as tetraciclinas diminuem de forma indirecta a taxa de reabsorção óssea (Vernillo et al, 1994).

O objectivo deste estudo é a avaliação do efeito da doxiciclina e minociclina, em diferentes concentrações, no comportamento de culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana, de modo a definir, dentro da gama de concentrações utilizadas terapêuticamente, níveis destes antibióticos que exercem um efeito positivo na actividade das células osteoblásticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CULTURAS CELULARES

As culturas de células osteoblásticas foram efectuadas a partir de medula óssea humana, obtida de procedimentos cirúrgicos ortopédicos correctivos efectuados a indivíduos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos, que não estavam a ser submetidos a qualquer tipo de terapêutica medicamentosa. A medula óssea foi cultivada de acordo com outros estudos (Fernandes *et al*, 1997, Coelho *et al*, 2000) em α -Minimal Essential Medium Eagle (α -MEM) enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF); foram igualmente adicionados $2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de fungizona e $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de gentamicina, de modo a evitar possíveis contaminações. As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO_2 e o meio foi mudado duas vezes por semana. Estas culturas foram mantidas até próximo da confluência e, nesta fase, as células foram libertadas enzimaticamente (solução de 0,04% de tripsina e 0,025% de colagenase), contadas num hemocítmetro (Celltac – NIHON KOHDEN) e semeadas em microplacas de 96 poços para cultura de células (COSTAR). As células em subcultura foram cultivadas (10^4 células. cm^{-2}) por um período de 35 dias na presença de ácido ascórbico ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$), β -glicerofosfato (10 mmol.L^{-1}) e dexametasona (10 nmol.L^{-1}), em condições controlo (ausência de antibióticos) e na presença de uma gama de concentrações de doxiciclina ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$) e de minociclina ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$). A monitorização das culturas foi feita diariamente, utilizando um microscópio de contraste de fase.

As culturas celulares mantidas em condições experimentais seleccionadas foram caracterizadas nos dias 3, 7, 14, 21, 28, e 35 para avaliação da morfologia celular, proliferação celular, actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

As culturas celulares foram caracterizadas relativamente à proliferação/viabilidade celular (ensaio do MTT), actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos minerais.

2.2.1. PROLIFERAÇÃO/VIABILIDADE CELULAR

Avaliada pelo ensaio do MTT que se baseia na redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado (Berridge, 1993).

Em cada dia seleccionado para este ensaio, foram adicionados $10 \mu\text{l}$ de MTT (5 mg.ml^{-1}) a cada poço e as células foram incubadas por um período de 4 horas, nas condições acima referidas. O MTT é então

incorporado pelas células metabolicamente activas, produzindo cristais de formazan de cor púrpura que se acumulam no seu interior. No final deste tempo, foram adicionados 100 μ l de Dimetilsulfóxido a cada poço. As placas foram agitadas à temperatura ambiente durante 1 minuto para dissolver os cristais de formazan, e em seguida, as amostras foram lidas num leitor ELISA (Denley Wellscan), a 600 nm.

2.2.2. ACTIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

Avaliada pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela fosfatase alcalina e determinação espectrofotométrica do p-nitrofenol formado.

Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas duas vezes com uma solução tampão, pH 7,4 (PBS) e foram adicionados 100 μ l de água destilada com 0,1% Triton X-100 a cada poço. Seguidamente, adicionaram-se 80 μ l de substrato (solução a 25 mmol.L⁻¹ de p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino) a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C, por um período adicional de 30 minutos. A reacção foi interrompida pela adição de 20 μ l de NaOH 5 M. A absorvância de cada amostra foi determinada a 405 nm num leitor ELISA (Denley Wellscan) e comparada com os valores obtidos para uma série de padrões de p-nitrofenol.

2.2.3. IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE DEPÓSITOS MINERALIZADOS: MÉTODO DA ALIZARINA VERMELHA

A alizarina vermelha, em solução aquosa, combina-se com o cálcio, originando um precipitado vermelho denso.

Após a fixação (1,5% glutaraldeído em 0,14 M tampão cacodilato de sódio durante 10 minutos), as culturas foram cobertas com uma solução de S alizarin sulfonato de sódio (0,028% v/v em NH₄OH) a 1%, pH 6,4, durante 2 minutos, sendo depois lavadas com água destilada e etanol ácido (etanol a 95%, HCl a 0,01% v/v).

A reacção positiva traduz-se no aparecimento de depósitos vermelhos na matriz.

2.2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados neste trabalho são o resultado de três experiências separadas, realizadas em culturas celulares obtidas a partir de três doadores diferentes de medula óssea (doadores de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20-60 anos). Em cada uma das experiências e para cada um dos ensaios bioquímicos foram efectuadas oito réplicas. Os resultados bioquímicos são apresentados como média \pm desvio padrão.

As médias obtidas nas várias experiências foram comparadas por uma análise de variância (ANOVA), tendo-se verificado a não existência de diferenças significativas entre as experiências realizadas. Em cada experiência, as diferenças estatísticas observadas entre as culturas em estudo e a cultura controlo respectiva foram determinadas pelo método de Bonferroni, em que os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo sugerem que a exposição de células de medula óssea humana, cultivadas em condições que favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, a uma concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ quer de doxiciclina, quer de minociclina resultou num aumento da proliferação celular durante a fase exponencial, que foi acompanhado pela expressão das funções osteoblásticas (elevada actividade da fosfatase alcalina e formação de depósitos de fosfato de cálcio). Estes resultados sugerem que, para além das suas propriedades antimicrobianas e anti-colagenolíticas, estes dois antibióticos pertencentes ao grupo das tetraciclina, quando utilizados em baixas concentrações, actuam como promotores da proliferação das células osteoblásticas.

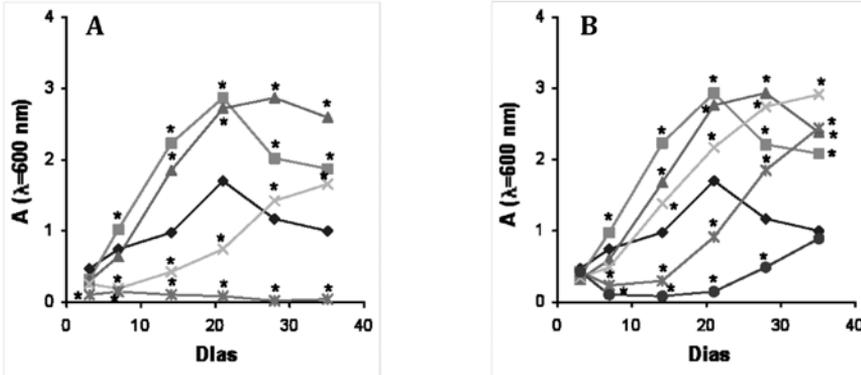


Figura 1. Proliferação/viabilidade celular de culturas de medula óssea humana mantidas na presença de doxiciclina (A) e minociclina (B), nas seguintes concentrações: $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (■), $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (▲), $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (○), $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (*) e $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (◊); situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA + β -GF + Dex) (◆).

*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram $< 20\%$.

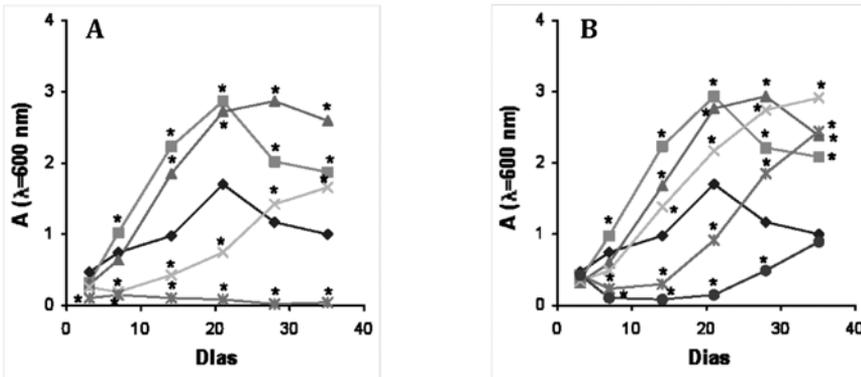


Figura 2. Actividade da fosfatase alcalina de culturas de medula óssea humana mantidas na presença de doxiciclina (A) e minociclina (B), nas seguintes concentrações: $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (■), $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (▲), $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (○), $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (*) e $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (◊); situação controlo (culturas efectuadas na presença de AA + β -GF + Dex) (◆).

*Significativamente diferente das culturas que cresceram em situação controlo. Os desvios padrão observados foram $< 20\%$.

	21 dias	28 dias	35 dias
Controlo	+	++	+++
D1	+	++	+++
D5	+/-	++	++
D10	-	-	-
D25	-	-	-

Tabela I. Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de Alizarina vermelha) nos dias 21, 28 e 35 dias, em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas na presença de doxiciclina, nas seguintes concentrações: 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (D1), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (D5), 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (D10) e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (D25).

	21 dias	28 dias	35 dias
Controlo	+	++	+++
M1	+	++	+++
M5	-	+	++
M10	-	-	-
M25	-	-	-
M50	-	-	-

A intensidade da coloração é definida do seguinte modo: -, coloração negativa; +, coloração positiva de fraca intensidade; ++, coloração positiva de média intensidade; +++, coloração positiva de elevada intensidade.

Tabela II. Reacção histoquímica para a detecção de depósitos de fosfato de cálcio (método de Alizarina vermelha) nos dias 21, 28 e 35 dias, em culturas de células osteoblásticas de medula óssea humana mantidas na presença de minociclina, nas seguintes concentrações: 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (M1), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (M5), 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (M10), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (M25) e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (M50).

As culturas celulares tratadas com 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de doxiciclina ou minociclina apresentaram uma indução do crescimento celular, mas os marcadores da diferenciação osteoblástica não foram estimulados na mesma proporção; a detecção de depósitos mineralizados foi mais tardia nas culturas tratadas com 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de minociclina e em ambos os casos a mineralização foi mais fraca. A exposição das células a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de minociclina pareceu estimular o crescimento destas, mas não afectou de igual modo os níveis de fosfatase alcalina; na presença desta concentração, a população celular foi mais proliferativa mas menos diferenciada, como se pode comprovar pela ausência de formação de áreas mineralizadas.

As concentrações de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de doxiciclina e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de minociclina perturbaram significativamente o comportamento normal das culturas celulares. Os resultados sugerem que estas concentrações exerceram um efeito inibitório na proliferação celular durante as fases inicial e exponencial do período de cultura, atrasando deste modo a fase de proliferação que está associada à formação de uma matriz extracelular e o aparecimento de áreas mineralizadas. Os resultados aqui obtidos também mostraram que concentrações relativamente elevadas destes antibióticos (25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de doxiciclina e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de minociclina) foram citotóxicas para as células de medula óssea humana.

É de salientar que a partir de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a doxiciclina apresenta uma toxicidade mais elevada para as células de medula óssea que iguais concentrações de minociclina. Assim, por exemplo, para a concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ observou-se crescimento celular na presença de minociclina mas não de doxiciclina. Esta observação pode eventualmente estar relacionada com a potência dos dois fármacos relativamente às funções afectadas nestas células. Este facto observa-se, por exemplo, relativamente à eficácia antimicrobiana da doxiciclina e minociclina; estes fármacos afectam a síntese proteica bacteriana e para uma parte significativa dos microorganismos sensíveis, a doxiciclina é activa em menores concentrações que a minociclina (Guimarães, 1997).

As concentrações plasmáticas de doxiciclina e minociclina que se obtêm com os esquemas terapêuticos anti-infecciosos normalmente utilizados situam-se na gama dos 2 a 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Martindale, 1999). Ambos os compostos são relativamente lipossolúveis e atingem os vários órgãos e fluidos do organismo, incluindo o microambiente ósseo. Assim, os resultados deste estudo sugerem que a utilização terapêutica destas

duas tetraciclina resulta em níveis que podem afectar as células osteoblásticas e que, para as concentrações plasmáticas observadas, o efeito se traduz num aumento da proliferação celular. Deve também ter-se em consideração que as tetraciclina são usadas topicamente no tratamento da doença periodontal. Neste caso, são frequentemente utilizadas preparações de libertação prolongada, situação em que as concentrações do fármaco que se obtêm nas bolsas periodontais são bastante mais elevadas que as observadas com a utilização sistémica destes compostos e, normalmente, superiores aos 25-50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Assim, no caso da utilização deste tipo de preparações deve considerar-se a possibilidade de ocorrência de efeitos citotóxicos nas células locais, nomeadamente do ligamento periodontal e osso alveolar.

4. CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que, para além das suas propriedades antimicrobianas e anti-colagenolíticas, estes dois antibióticos, quando utilizados em baixas concentrações, actuam como promotores da proliferação das células osteoblásticas, favorecendo principalmente o crescimento de populações celulares menos diferenciadas. A exposição das células a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de minociclina parece estimular o aparecimento de uma população celular mais proliferativa mas menos diferenciada. As concentrações de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de doxiciclina e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de minociclina causaram um efeito deletério no comportamento das culturas celulares, atrasando a fase de proliferação que está associada à formação de uma matriz extracelular e o aparecimento de áreas mineralizadas.

Os resultados aqui obtidos também mostram que concentrações relativamente elevadas destes antibióticos (25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de doxiciclina e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de minociclina) são citotóxicas para as células de medula óssea humana. É de salientar que a mesma concentração dos dois antibióticos pode ter efeitos diferentes nas culturas celulares, tal como se observou para as concentrações de 10 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5. BIBLIOGRAFIA

- BERRIDGE, V., Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *In: Arch. Biochem. Biophys.*, 303, pp. 474-482.
- CHAUDHARY, L.R., Avioli, L.V. (1994). Dexamethasone regulates 1L-1 β and TNF- α -induced interleukin-8 production in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. *In: Calcif. Tissue Int.*, 55, pp. 16-20.
- COELHO, M.J., Trigo Cabral, A., Carvalho, G.S., Fernandes, M.H. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. *In: Biomaterials*, 21, pp. 1087-1094.
- COELHO, M.J., Fernandes, M.H. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: Effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone in the osteoblastic differentiation. *In: Biomaterials*, 21, pp.1095-1102.
- FERNANDES, M.H., Costa, M.A., Carvalho, G.S. (1997). Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *In: Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(2), pp. 61-65.
- GOLUB, L.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T.F. (1991). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *In: Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2(2), pp. 297-322.
- GUIMARÃES, S. (1997). Tetraciclina e cloranfenicol. *In: Garrett, J., Osswald, W., Guimarães, S. (Ed.) Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas. Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. II vol.* Porto Editora, 3ª ed., pp. 935-944.
- MARTINDALE, (1999). *The complete drug reference*. 32ª ed. Ed. Parfitt, K. Pharmaceutical Press, pp. 202-227.

- RIFKIN, B.R., Vernillo, A.T., Golub, L.M., Ramamurthy, N.S. (1994). Modulation of bone resorption by tetracyclines^a. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 732, pp. 165-180.
- SEYMOUR, R.A., Heasman, P.A. (1992). *Drug, Diseases, and the Periodontium*. Oxford Medical Publications, pp. 180-186.
- SOUSA, J.C. (2005). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 423-482.
- VERNILLO, A.T., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Rifkin, B.R. (1994). The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease. In: *Current Science*, pp. 111-118.