

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA



David Jonathan Rodrigues Gusman

***“Resposta imunoinflamatória na
periodontite experimental induzida em
ratos submetidos à quimioterapia: estudo
histomorfométrico e imunoistoquímico”***

ARAÇATUBA – SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

David Jonathan Rodrigues Gusman

***“Resposta imunoinflamatória na
periodontite experimental induzida em
ratos submetidos à quimioterapia: estudo
histomorfométrico e imunoistoquímico”***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

ARAÇATUBA – SP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

G982r

Gusman, David Jonathan Rodrigues.

Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia : estudo histomorfométrico e imunoistoquímico / David Jonathan Rodrigues Gusman. - Araçatuba, 2017
87 f.; 4 il.; 6 tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida
Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia

1. Perda do osso alveolar 2. Doenças periodontais 3. Quimioterapia 4. Defeitos da furca 5 Modelos animais I. Título

Black D24

CDD 617.67

Dados curriculares

David Jonathan Rodrigues Gusman

Nascimento: 14.03.1992 Presidente Prudente - SP

Filiação: Maria Socorro Rodrigues

José Gusman Rodrigues

2010-2014: Curso de Graduação em Odontologia

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

À Deus

Neste momento ofereço esta conquista à Deus, que me deu força e persistência para ultrapassar todos os obstáculos encontrados, iluminando meu caminho em todos os momentos em que precisava de luz, não permitindo que eu desistisse nesta longa caminhada.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

Aos Meus Pais

À minha mãe **Maria**, ao meu pai **José**.

Ambos me proporcionaram todo suporte para a vida, contribuindo para minha a formação pessoal e profissional.

Se não fosse vocês, não conseguiria realizar mais um sonho.

Compartilho com vocês os méritos desta conquista.

Amo vocês.

Aos Meus Familiares

À minha irmã **Dejane**, meu irmão **Darcio** e sobrinhas **Amanda** e **Luiza**.

Dedico este trabalho aos meus irmãos e sobrinhas por fazerem parte da minha motivação e alegria.

Agradeço todo carinho e força que me deram em todo momento que estive fora, se não fossem vocês, seria tudo mais difícil.

Obrigado por caminharem ao meu lado!

*Dedico este trabalho também à família **Paganini Agostinho**.*

A **Maria Aparecida**, **Antônio Carlos** e **Dênis**, agradeço por todas orações, conversas e conselhos encorajadores e suporte que me deram.

E também à **Bárbara**, por todo carinho, amor, compreensão e companheirismo que me proporcionou em todo momento que estive aqui.

A todos, peço desculpas por minha ausência em momentos importantes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, primeiramente pela confiança depositada em mim e também pela oportunidade que me proporcionou em ser seu orientado. Ao percorrer do tempo pude perceber que estava ao lado de um grande mestre, humilde, paciente, sempre disposto a ensinar e ajudar. Sempre direi que foi uma honra ter sido seu orientado e um privilégio enorme poder compartilhar suas cirurgias, aulas e ensinamentos. Minha sincera gratidão ao senhor, pessoa na qual, me espelho muito.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia, agradeço por me auxiliar durante esta caminhada. O senhor marcou por todo seu carinho e atenção. Sempre perguntando como estão nossos projetos pessoais e preocupado com o nosso andar na pós-graduação. Além disso, o seu exemplo como professor e pesquisador é um marco para todos. Muito obrigado pela oportunidade e por ter contribuído para este momento se tornar realidade!

À Prof^a. Dr^a Maria José Hitomi Nagata, Agradeço pela oportunidade de iniciar a pós-graduação em um dos melhores programas do Brasil, no qual a senhora era a coordenadora e se esforçou muita para essa realidade ser presente hoje. Admiro muito sua serenidade, humildade e dedicação com que conduz o ensino e a pesquisa. Além disso, sou grande admirador de seu trabalho e de sua competência.

À Prof.^a Dr^a. Letícia Helena Theodoro, agradeço pelos ensinamentos transmitidos em suas aulas e conversas. Exemplo de professora e pesquisadora, prática, objetiva e extremamente competente. Obrigado pelo convívio agradável. É sempre um prazer estar em sua companhia!

À Prof^a. Dr^a. Suely Bonfim, e sua equipe do Curso de Medicina Veterinária. Agradeço pela grande contribuição para a elaboração desse trabalho. Não só isso, agradeço por todo carinho quando estive em sua presença. Professora, dedicada, competente, não há palavras para agradecer todo seu esforço e dedicação com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino, sou grato ao senhor por toda contribuição para o término deste trabalho. Obrigado pela presença sempre tranquila, transmitindo com paixão seus conhecimentos de ciência e histologia. Além disso, poder presenciar suas aulas e seus ensinamentos foram extremamente fundamentais para meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco, foi um prazer conhecer este grande mestre, uma pessoa fantástica que nos ensina com maestria e de forma humilde. Agradeço por compartilhar conosco seus ensinamentos nas clínicas de periodontia.

“Um professor afeta a eternidade; é impossível dizer até onde vai sua influência.”

(Henry Adams)

À amiga Vivian Cristina Noronha Novaes, *se não fosse por sua ajuda, esse trabalho não teria sido realizado. Posso dizer que muito do que aprendi com relação a trabalhos em animais foi devido a sua ajuda. Sou muito grato por ter me ensinado muitas coisas e por continuar me ajudando e ensinando. Você é uma pessoa que admiro muito.*

Ao meu amigo Henrique Rinaldi Matheus, *Golden boy! Garoto talentoso, brilhante, sempre disposto e prestativo. Você é um garoto muito especial, que traz orgulho para todos com que convive. Não há palavras para agradecer toda sua amizade. Agradeço também por me ajudar em loucuras (revisões sistemáticas e outros projetos) que fizemos em conjunto com nosso orientador. Você é um grande irmão.*

Ao meu grande amigo João Martins de Mello Neto, *outro garoto fantástico, talentoso e brilhante. Uma pessoa que levarei para sempre como amigo. Um ano morando com você de muitas risadas e muito trabalho. Acredito que nunca esqueceremos dessas noites dormindo muito tarde e trabalhando arduamente para crescermos juntos. Agradeço por sua amizade, e fica aqui minha admiração pela pessoa que você é, um grande amigo, parceiro e irmão.*

À amiga Paula Lazilha Faleiros, *agradeço por me ajudar sempre que precisei. Me ensinou muitas coisas e me ajudou muito desde o início. Você é uma pessoa dedicada, talentosa, gentil, além disso, uma grande amiga.*

À amiga Nathália Januário de Araujo, *obrigado pela disponibilidade e companheirismo sempre. Não me esqueço de que foi uma das primeiras pessoas que tive contato e caminhou comigo sempre durante o mestrado. Agradeço pela amizade, ajuda e companheirismo sempre que precisei. Muito obrigado.*

Ao amigo Breno Edson Sendão Alves, agradeço pela amizade, muitas risadas e companheirismo sempre. Um menino que chegou a pouco tempo e já conquista à todos por ser uma pessoa incrível.

Ao amigo Fred Lucas Pinto Oliveira, obrigado pela companhia sempre bem vinda. Grande amigo, gentil, sorridente, foi um prazer trabalhar com você e estar ao seu lado, você transmite muita felicidade por onde passa .

Ao amigo Luiz Guilherme Fiorin, agradeço pela amizade e desejo boa sorte na caminhada da pós-graduação.

Aos Alunos de iniciação científica (Clara, Giovani, Guilherme e Amanda Fioravante), Agradeço pelos momentos que precisei e vocês sempre estiveram disponíveis para ajudar. Sou muito grato por esse companheirismo e desejo tudo de melhor à vocês, sempre que precisarem estarei aqui.

Aos queridos amigos da pós-graduação, Daniela, Marta Nuernberg, Marina Módulo e Natalia Campos, agradeço pelo carinho e agradável convívio!

À todos os professores do mestrado,

Vocês foram importantes e contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada durante estes anos.

A todos os colegas do mestrado,

Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade criada neste período.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas da ex-Diretora **Prof.^a Ana Maria Pires Soubhia** e do senhor ex-Vice-Diretor e atual Diretor **Prof. Wilson Roberto Poi**, e do atual senhor Vice-Diretor **Prof. João Eduardo Gomes Filho** por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de pós-graduação e crescimento profissional.

A ex-coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa da **Prof.^a Maria José Hitomi Nagata**, e a atual coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do **Prof. André Luiz Fraga Briso**.

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas Áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Integrada, Estomatologia, Dentística e Prótese Dental.

Aos Funcionários e ex-funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – **Renato, Marco, Paulo e Joilson** obrigado pela ajuda e disposição.

A todos os funcionários e estimados amigos da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Cláudio Hideo Matsumoto, Ana Claudia Grieger Manzatti, Luzia Anderlini, Denise Haruyo Nakamura Maeda, Luís Cláudio Sedlacek, Ana Paula Rímoli de Oliveira e Maria Cláudia de Castro Benez**, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos,**

Lilian Sayuri Mada pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

A todos os funcionários de todos os setores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o conforto e o bom funcionamento desta instituição

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por sempre me acolherem tão bem.

Aos funcionários do Biotério, **Camilo, Arnaldo e João** que contribuíram para realização da parte experimental.

Aos professores da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

Aos pacientes, que nos depositando confiança, deram-nos a oportunidade de aprender.

Finalmente, agradeço à **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas maravilhosas em meu caminho.

OBRIGADO!

“Mamãe me disse, quando eu era jovem: - Venha, sente ao meu lado filho e ouça o que eu vou lhe dizer, se você fizer isso, irá te ajudar em algum dia ensolarado. Aproveite seu tempo, não viva com tanta pressa, problemas virão e eles irão embora, você vai achar uma mulher e vai achar um amor mas não se esqueça que há alguém lá em cima (Deus).
E seja um homem simples, algo que você ame e entenda.”

(Lynyrd Skyrnyrd – Simple man)

Gusman, DJR. **Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico.** 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2003.

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito dos quimioterápicos 5-Fluorouracil (5-FU) e da Cisplatina (CIS) sob os tecidos periodontais saudáveis e durante os estágios iniciais da periodontite experimental (PE) induzida em ratos. No presente estudo, foram utilizados 156 ratos machos, distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: SPE-SS (n= 26): sem indução da PE e que receberam administração de solução salina (grupo *Sham*); SPE-CIS (n= 21) – sem indução da PE e que receberam administração de CIS; SPE-5FU (n= 27) – sem indução da PE e que receberam administração de 5-FU; PE-SS (n= 27): indução da PE e que receberam administração de solução salina; PE-CIS (n= 28) - indução da PE e que receberam administração de CIS; PE-5FU (n= 27) - indução da PE e que receberam administração de 5-FU. Os animais receberam 2 injeções para administração dos quimioterápicos com intervalo de 48 horas entre elas (períodos: baseline e 02 dias), aplicando-se as doses de 5 mg/kg e 2,5mg/kg (CIS) e 60 mg/kg e 40 mg/kg (5-FU). Logo após a primeira injeção, foi realizado a indução da PE adaptado-se um fio de algodão número 24 ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Nos períodos de 03, 05 e 07 dias após indução da PE, os animais foram eutanasiados pela administração de dose letal de thiopental (150mg/kg). Para análise hematológica de leucócitos totais (LT), foram obtidas amostras sanguíneas no baseline e no último período de eutanásia e para fosfatase alcalina (FA) no baseline e em todos os períodos

experimentais. As mandíbulas obtidas foram fixadas em formaldeído tamponado 4%, descalcificadas em EDTA e incluídas em parafina para confecção de cortes histológicos seriados de 4 µm de espessura no sentido méso-distal para coloração com Hematoxilina e Eosina e realização de reações imunoistoquímicas. Foi realizada análise histológica (escores), histométrica de porcentagem de osso na furca (POF) e padrões de imunomarcção para TNF α , IL-1 β e RANKL (escores). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$) em programa computacional especializado. Observou-se uma diminuição nos níveis de LT nos grupos SPE-5FU e PE-5FU aos 7 dias. A FA sérica diminuiu aos 3, 5 e 7 dias nos grupos SPE-CIS, SPE-5FU, PE-SS, PE-CIS e PE-5FU. Histologicamente, SPE-CIS e SPE-5FU obtiveram uma exacerbação do processo inflamatório comparado ao SPE-SS, isso foi condizente com os resultados imunoistoquímicos, com maior padrão de imunomarcção para TNF α e IL-1 β . Para PE-CIS e PE-5FU houve maior exacerbação do processo inflamatório comparados com os demais grupos, isso foi condizente com os resultados imunoistoquímicos, com maior padrão de imunomarcção para TNF α e IL-1 β aos 3 e 7 dias e RANKL aos 7 dias. Deste modo, houve menor POF nos grupos PE-CIS e PE-5FU comparado ao PE-SS em todos períodos experimentais, além disso, PE-5FU apresentou menor POF até mesmo comparado ao PE-CIS aos 5 e 7 dias. Diante dos limites do presente estudo, pode-se concluir que os quimioterápicos promoveram uma exacerbação do processo inflamatório nos tecidos periodontais saudáveis e agravaram a progressão da PE em seu estágio inicial.

Palavras chaves: perda óssea alveolar; doenças periodontais; quimioterapia; defeitos de furca; modelos animais.

Gusman, DJR. **Immunoinflammatory response in induced experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy: histomorphometric and immunohistochemical study.** 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2003.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of the chemotherapeutics 5-Fluorouracil (5-FU) and Cisplatin (CIS) on healthy periodontal tissues and during the early stages of induced experimental periodontitis (EP) in rats. 156 male rats were randomly set in 6 groups: NP-SS (n = 26): without EP induction and received saline solution (Sham group); NP-CIS (n = 21) - without EP induction and received CIS; NP-5FU (n = 27) - without EP induction and received 5-FU; EP-SS (n = 27): induction of EP and received saline solution; EP-CIS (n = 28) - induction of EP and received CIS; EP-5FU (n = 27) - induction of PE and received 5-FU. The animals received 2 injections of chemotherapeutics with 48-hour interval between them, with doses of 5 mg/kg and 2.5 mg/kg (CIS) and 60 mg/kg and 40 mg/kg (5-FU). After the first injection, the induction of EP was performed by the placement of a number 24 cotton thread around the lower left first molar. At 03, 05 and 07 days after EP induction the animals were euthanized by administration of thiopental (150mg/kg). For hematological analysis of total leukocytes (TL), blood samples were obtained at baseline and in the last euthanasia period, and for Alkaline Phosphatase (AP), at baseline and in all experimental periods. The collected mandibles were fixed in buffered 4% formaldehyde, demineralized in EDTA and embedded in paraffin for preparation of serial histological sections of 4 µm thickness in mesiodistal direction for Hematoxylin

and Eosin staining and immunohistochemical reactions. Histologic (scores), histometry of the percentage of bone in the furcation (PBF) and immunolabelling standards for TNF α , IL-1 β and RANKL (scores) analyzes were performed. The data were submitted to statistical analysis ($p < 0.05$) in a specialized computer program. A decrease of the TL levels in NP-5FU and EP-5FU groups was observed at 7 days. Serum AP decreased at 3, 5 and 7 days in NP-CIS, NP-5FU, EP-SS, EP-CIS and EP-5FU. Histologically, NP-CIS and NP-5FU presented an exacerbation of the inflammatory process compared to the NP-SS, this was consistent with the immunohistochemical results, with higher immunolabelling pattern of TNF α and IL-1 β . In EP-CIS and EP-5FU was observed an increased exacerbation of the inflammatory process compared to the other groups, this was consistent with the immunohistochemical results, with a higher immunolabelling pattern for TNF α and IL-1 β at 3 and 7 days, and RANKL at 7 days. Thus, there was a smaller POF in EP-CIS and EP-5FU compared to the EP-SS in all experimental periods, moreover, EP-5FU presented smaller POF even compared to EP-CIS at 5 and 7 days. Given the limitations of the present study, it can be concluded that chemotherapy exacerbated the inflammatory process in healthy periodontal tissues and aggravated the progression of EP in its initial stage.

Key words: alveolar bone loss, periodontal disease; chemotherapy; furcation defect; animal models.

Manuscrito para publicação

Tabela 1	Análise histológica da intensidade da resposta inflamatória local e extensão do processo inflamatório de acordo com escores, grupos e períodos.	61
Tabela 2	Análise histológica da intensidade da reabsorção radicular externa (cimento e dentina) e reabsorção óssea alveolar de acordo com escores, grupos e períodos.	62
Tabela 3	Análise histológica do padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca de acordo com escores, grupos e períodos.	63
Tabela 4	Análise histológica do padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca de acordo com escores, grupos e períodos.	64

Tabela 5	Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos da POF (%) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.	65
Tabela 6	Porcentagem do padrão de imunomarcção para $TNF\alpha$, IL- 1β e RANKL de acordo com cada grupo e período.	66

Manuscrito para publicação

- Figura 1 Gráficos mostrando: **A:** número de leucócitos totais no sangue em cada grupo experimental nos períodos do baseline e 7 dias. *Diferença estatisticamente significativa com 7 dias. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0.05$) **B:** níveis séricos da fosfatase alcalina em cada grupo experimental nos períodos do baseline, 3, 5 e 7 dias. *Diferença estatisticamente significativa com Baseline. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$). 67
- Figura 2 **Fotomicrografias evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior de ratos modificados sistemicamente por quimioterápicos sem periodontite experimental (SPE) nos períodos de 3 e 7 dias. A-D:** A porcentagem de osso na furca (POF) e a magnitude da resposta inflamatória expressam um quadro de normalidade periodontal em ratos que receberam administração de solução salina. **B-E, C-F:** A pequena quantidade de células inflamatórias expressam um quadro de inflamação periodontal sem alteração na POF em ratos que receberam administração de Cisplatina e 5-Fluorouracil. Abreviações: pd: polpa dental; oa: osso alveolar. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 μ m. 68
- Figura 3 **Fotomicrografia evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior de ratos modificados sistemicamente por quimioterápicos e com periodontite experimental (PE) induzida nos períodos de 3 e 7 dias. A-D:** Animais que receberam administração de solução salina (SS). A porcentagem de osso na furca (POF) e a magnitude da resposta inflamatória expressam menor comprometimento periodontal em ratos que receberam administração de SS em comparação com 69

ratos modificados sistemicamente por quimioterápicos. **B-E**: Animais que receberam administração de Cisplatina (CIS). A POF e a magnitude da resposta inflamatória expressam maior severidade da PE em ratos que receberam administração de CIS em comparação ao grupo PE-SS aos 3 e 7 dias. **C-F**: Animais que receberam administração de 5 Fluorouracil (5-FU). A POF e a magnitude da resposta inflamatória expressam maior severidade da PE em ratos que receberam administração de 5-FU em comparação ao grupo PE-SS aos 3 e 7 dias e em comparação ao grupo PE-CIS aos 7 dias. Abreviações: oa: pd: polpa denta; oa: osso alveolar; *: processo inflamatório. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 μ m.

Figura 4

Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TNF α (A-C), IL-1B (D-F) e RANKL (G-I) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental (PE) induzida no período de 7 dias: A, D, G: Grupo PE-SS aos 7; B, E, H: Grupo PE-CIS aos 7 dias; C, F, I: Grupo PE-5-FU aos 7 dias; Contra-coloração: Hematoxilina. Barras de escala 25 μ m.

70

Lista de Abreviaturas e Siglas

5-FU – 5 Fluorouracil.

AF - Área total da furca.

ANOVA – Análise de Variância.

AO - Área ocupada por tecido ósseo.

ARRIVE - Animal Research: Reporting in Vivo Experiments

CEEA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIS – Cisplatina

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DP - Doença Periodontal.

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético.

FA – Fosfatase Alcalina

g – Grama.

IL – Interleucina

LT – Leucócitos Totais.

mg – Miligramas.

mg/Kg - Miligramas por quilo.

ml - Mililitros

mm² – Milímetros quadrado.

Lista de Abreviaturas e Siglas

PE – Periodontite experimental.

POF - Porcentagem de Osso na Furca.

RANKL - Receptor ativador de NF-Kappa B ligante.

SPE – Sem Periodontite Experimental

SS – Solução Salina

TNF α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

μm – Micrometros.

Lista de Anexos

Anexo

A	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CCEA)	71
---	--	----

Anexo

B	Delineamento do estudo.	72
---	-------------------------	----

Anexo

C	Figura representativa da metodologia adotada para análise da histometria.	72
---	---	----

Anexo

D	Normas de publicação segundo o Periódico “Journal of Clinical Periodontology”.	73
---	--	----

Sumário

Manuscrito para publicação	25
Página de título	26
Resumo	27
Introdução	29
Materiais e Métodos	32
Resultados	38
Discussão	43
Conclusão	47
Agradecimentos	48
Referências	49
Anexos	71

*Manuscrito para
Publicação¹*

¹ Normatização Segundo a Revista *Journal of Clinical Periodontology*.

Título

Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico

Autores:

David Jonathan Rodrigues Gusman¹, Valdir Gouveia Garcia¹, Juliano Milanezi de Almeida^{1*}.

¹São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

Running title: Quimioterápicos e a periodontite experimental.

***Corresponding author:**

Juliano Milanezi de Almeida

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836363239

E-mail: jumilanezi@hotmail.com

Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos quimioterápicos 5-Fluorouracil (5-FU) e Cisplatina (CIS) sobre tecidos periodontais saudáveis e durante os estágios iniciais da periodontite experimental (PE) induzida em ratos. **Metodologia:** 156 ratos machos foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: SPE-SS: sem indução da PE e receberam solução salina; SPE-CIS: sem indução da PE e receberam CIS; SPE-5FU: sem indução da PE e receberam 5-FU; PE-SS: indução da PE e receberam solução salina; PE-CIS: indução da PE e receberam CIS; PE-5FU: indução da PE e receberam 5-FU. Os animais receberam 2 injeções para administração dos quimioterápicos com intervalo de 48 horas (períodos: baseline e 02 dias), aplicando-se as doses de 5 mg/kg e 2,5mg/kg (CIS) e 60 mg/kg e 40 mg/kg (5FU). Nos períodos de 03, 05 e 07 dias os animais foram eutanasiados. Foram realizadas análises sanguíneas, histológica, histométrica de porcentagem de osso na furca (POF) e imunoistoquímica (TNF α , IL-1 β e RANKL). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$).

Resultados: Observou-se diminuição nos níveis de LT nos grupos SPE-5FU e PE-5FU aos 7 dias. A FA sérica diminuiu aos 3, 5 e 7 dias nos grupos SPE-CIS, SPE-5FU, PE-SS, PE-CIS e PE-5FU. Histologicamente, SPE-CIS e SPE-5FU mostraram um agravamento do processo inflamatório mais intenso que SPE-SS, com maior padrão de imunomarcção para TNF α e IL-1 β . Os grupos PE-CIS e PE-5FU apresentaram exacerbação do processo inflamatório comparados com os demais grupos, com maior padrão de imunomarcção para TNF α e IL-1 β aos 3 e 7 dias e RANKL aos 7 dias. Houve menor POF em PE-CIS e PE-5FU que em PE-SS em todos períodos experimentais. Além disso, PE-5FU apresentou menor POF que PE-CIS aos 5 e 7 dias.

Conclusão: Os quimioterápicos promoveram exacerbação do processo inflamatório nos tecidos periodontais saudáveis e agravaram a progressão da PE em seu estágio inicial.

Palavras chaves: perda óssea alveolar; doenças periodontais; quimioterapia; defeitos de furca; modelos animais.

1. Introdução

Os tecidos periodontais saudáveis, e em especial quando acometidos pela doença periodontal (DP), podem ser afetados por uma variedade de drogas, principalmente aquelas que interagem com a resposta imune e inflamatória (Alani & Saymour, 2014). Medicamentos como antidepressivos, benzodiazepínicos, imunossuppressores, anticonvulsivantes, contraceptivos orais e anti-hipertensivos podem causar modificações sistêmicas, influenciando na progressão da DP (Seymour, 2006; Spolidorio et al. 2007; Nassar et al. 2009; Nakib & Ashrafi, 2011; Aguiar et al. 2013; Gomes et al. 2013; Preshaw, 2013; Kim et al. 2013; Araújo et al. 2013). Os antineoplásicos também têm sido estudados como medicamentos que podem influenciar a progressão da DP (Garcia et al. 2015; Theodoro et al. 2016).

Esses medicamentos produzem efeitos adversos na cavidade bucal por não apresentarem ação exclusivamente sobre as células cancerosas, promovendo efeitos lesivos sobre tais células e também sobre tecidos normais, especialmente aqueles compostos por células com alto índice proliferativo (Guggenheimer et al. 1977; Guchelaar et al. 1998; McGuire, 2002; Arias, 2008).

A maioria dos casos de quimioterapia para o tratamento do câncer se baseia na administração de uma dose máxima tolerável pelo paciente, promovendo a erradicação do maior número de células tumorais. O principal problema desse método é a toxicidade aguda acumulada para os tecidos normais, incluindo as células do sistema imune. Assim, a quimioterapia convencional está comumente associada com uma variedade de efeitos colaterais, como severa imunossupressão (Saltz & Kemeny, 1996; Half & Arber, 2009).

Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, a Cisplatina (CIS) e o 5-Fluorouracil (5-FU) se destacam por serem drogas amplamente utilizadas (Taylor et al. 1994; Maring et al. 2002; Surendiran et al. 2010; Lorch et al. 2011; Vermorken et al. 2014). A CIS é um composto com ampla atividade antineoplásica, sendo utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, dentre os quais os de cabeça e pescoço, testículo, pulmão, mama, urotelial, ovário, glândula adrenal, carcinoma de bexiga e melanoma avançado (Wang & Lippard, 2005; Pang et al. 2007; Zhang et al. 2009; Mihai, 2015; Linardou et al. 2015; Choi et al. 2015). Com relação ao 5-FU, este é um antimetabólito do tipo análogo da pirimidina, com amplo espectro de ação contra tumores sólidos de cabeça e pescoço, trato gastrointestinal, ovário, fígado, cérebro e mama (van Kuilenburg et al. 2003; Arias, 2008).

Sabe-se que a resposta de defesa do organismo está associada com um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos. As interleucinas-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, fator inibidor de leucemia, oncostatina M e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) podem induzir a reabsorção óssea periodontal de duas formas, pela concentração das citocinas (devendo ser suficientes para ativar a reabsorção óssea) e pela proximidade crítica em relação ao osso alveolar (Cochran, 2008; Kayal 2013; Dosseva-Panova et al. 2014).

Estudos relataram que a CIS é capaz de induzir o aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF α , proteína quimiotática de monócitos-1 e proteína inflamatória de macrófagos-2 em tecidos renais (Miller et al. 2010; Ozkok & Edelstein, 2014). Por outro lado, o 5-FU foi capaz de expressar as citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β , IL-6 e TNF α e o complexo proteico fator nuclear kappa B em lesões sobre mucosa intestinal (Logan et al. 2007; Chang et al. 2012; Fang et al. 2014).

Em relação aos efeitos dos quimioterápicos nos tecidos periodontais, estudos realizados em nosso laboratório (Garcia et al. 2015; Theodoro et al. 2016) têm demonstrado que o 5-FU promove acentuada perda óssea na área de furca, grande infiltrado inflamatório, alto padrão de imunomarcção para receptor ativador de NF-Kappa B ligante (RANKL) e agravamento da evolução da PE em períodos longos.

Os mecanismos exatos pelos quais os quimioterápicos promovem severa destruição do aparato de sustentação periodontal não estão totalmente elucidados, e estudos para avaliar a influências dessas drogas nos estágios iniciais da PE são necessários para a elucidação desses mecanismos.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos quimioterápicos 5-FU e da CIS sob os tecidos periodontais saudáveis e durante os estágios iniciais da PE induzida em ratos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo 156 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), pesando aproximadamente 250 a 300 g com aproximadamente 3 meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 5 dias. Todos os protocolos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, (protocolo nº 2015-00590) (Anexo A). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e segundo o guia The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010.).

2.2 Protocolo experimental

2.2.1. Protocolo da periodontite experimental

Para os procedimentos de indução da PE, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 70 mg/kg de peso corporal de cloridrato de ketamina (Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA) associado à 6 mg/kg de peso corporal de cloridrato de xilazina (Coopazine, Coopers, São Paulo, SP, Brasil).

No baseline foi executada a instalação de um fio de algodão número 24 nos primeiros molares inferiores esquerdos (Corrente Algodão nº24, Coats Corrente, São Paulo, SP,

Brasil) que foram mantidos em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos para a indução da PE (Johnson 1975; Bezerra et al. 2002; Kuhr et al. 2004; de Almeida et al. 2007).

2.2.2 Tratamento com as Drogas Quimioterápicas – (CIS e 5-FU)

A administração de Solução Salina a 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), 5-Fluorouracil (Fluorouracila, 250 mg/10 ml, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) ou Cisplatina (Fauldcispla, 10 mg/10 ml, Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) ocorreu pela via intraperitoneal com intervalo de 48 horas entre elas (períodos: baseline e 02 dias). A primeira dose de 5-FU foi de 60 mg/kg e a segunda de 40 mg/kg de peso corporal (Theodoro et al. 2016). Para a Cisplatina, a primeira dose foi de 5 mg/kg (Havelka et al. 2007) e a segunda de 2,5 mg/kg de peso corporal (Al-Mahalawy et al. 2016). Para ambos as drogas e as doses foram adaptações do protocolo empregado para terapia oncológica em humanos o qual considera a superfície corpórea para determinação da dose (Du Bois & Du Bois, 1989; Nakasato et al. 2012; Food and Drug Administration, 2016).

2.2.3 - Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos que consistiram em: SPE-SS (n= 26) – sem periodontite experimental e que receberam administração de solução salina; SPE-CIS (n= 21) – sem periodontite experimental e que receberam administração de Cisplatina; SPE-5FU (n= 27) – sem periodontite experimental e que receberam administração de 5-Fluorouracil; PE-SS (n= 27) - indução da PE e que receberam administração de solução salina; PE-CIS (n= 28) - indução da PE e que

receberam administração de Cisplatina.; PE-5FU (n= 27) - indução da PE e que receberam administração de 5-Fluorouracil.

2.2.4. Períodos experimentais e obtenção das amostras

Para a análise sanguíneas foram colhidos de cada animal por punção cardíaca 2 ml de sangue nos momentos 0 dia (baseline), 3 dias, 5 dias e 7 dias. Para análise histológica, histométrica e imunoistoquímica, os animais foram eutanasiados pela administração de dose letal de Tiopental (150 mg/kg de peso corporal) aos 3, 5 e 7 dias. (Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil).

2.3. Processamento Laboratorial

A mandíbula de cada animal foi removida, separada e fixada em formaldeído tamponado a 4%, por um período de 48 horas (Anexo B). Após fixação, os espécimes obtidos foram lavados em água corrente e descalcificados em solução de EDTA à 10%, com trocas semanais por um período médio de 8 semanas. Após processamento convencional e inclusão das amostras em parafina, cortes semi-seriados (4 µm) foram obtidos no sentido méso-distal. Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram corados com hematoxilina e eosina para análise histológica e histométrica. Outros três cortes foram submetidos ao processamento imunoistoquímico para detecção de TNF α , IL-1 β e RANKL. Esta seleção foi realizada por um examinador experiente (JMA), treinado e que desconheciam os tratamentos efetuados. Outros examinadores calibrados aos tratamentos efetuados realizaram as análises histológica (EE), histométrica (DJRG) e imunoistoquímica (EE).

2.4. Análise dos Resultados

2.4.1. Análise dos Leucócitos Totais e Fosfatase Alcalina

Dos 2 ml de sangue obtidos 0,5 ml foi acondicionado em microtubo tipo eppendorf, contendo anticoagulante (EDTA) a 10% para determinação dos Leucócitos Totais (LT) e 1,5 ml acondicionado em microtubo tipo eppendorf sem anticoagulante para a determinação da FA.

A contagem de LT foi realizada nos momentos baseline e 7 dias em contador de células automatizado (ABX Diagnostics, Montpellier, France) segundo Feldman, Zinkl & Jain 2000.

A determinação da FA foi realizada nos momentos 0 dias (baseline), 3 dias, 5 dias e 7 dias, pelo modo cinético, de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e analisados em espectrofotômetro semi-automatizado (SB-190 Celm, Barueri, SP, Brasil).

2.4.2. Análise histológica

Foi efetuada em microscopia óptica avaliando-se os seguintes parâmetros: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) reabsorção radicular externa (cimento e dentina); 4) reabsorção alveolar; 5) padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca; 6) padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca. Para cada parâmetro foi atribuído escore de 0 a 3.

2.4.3. Análise histométrica

Para a determinação da porcentagem de osso na furca (POF) foi utilizando um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). Foi mensurada a área total da furca (AF) e em seguida a área ocupada por

tecido ósseo (AO), ambas em mm². Posteriormente foi calculada a POF. A AF foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada a partir do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A partir desta linha seguiu-se todo o contorno da superfície externa do cimento situado entre as raízes. A AO teve o mesmo limite apical da AF e partir deste seguiu-se todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A POF foi calculada multiplicando-se AO por 100 e dividindo-se por AF ($POF = (AO \times 100) / AF$) (Anexo C). A POF de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados (Garcia et al. 2015).

2.4.4. Análise imunoistoquímica

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. A imunomarcção foi definida como aquela de coloração acastanhada presente predominantemente no compartimento citosólico das células e em menor escala à matriz extracelular. TNF α , IL-1 β (Garcia et al. 2016) e RANKL (Garcia et al. 2015) foram analisadas na AF com um aumento de 400x. Foi efetuada uma análise semi-quantitativa da imunomarcção no ligamento periodontal e no osso alveolar desta área em uma secção histológica de cada animal e os critérios para o estabelecimento do padrão de imunomarcção foram baseados em Garcia et al. 2015 e Garcia et al. 2016: (escore 3) alto padrão de imunomarcção ($\cong 3/4$ das células imunorreativas (IR) por área), (escore 2) moderado padrão de imunomarcção ($\cong 1/2$ das células-IR por área), (escore 1) baixo padrão de imunomarcção ($\cong 1/4$ das células-IR por área) e (escore 0) padrão de imunomarcção nulo (ausência total de células-IR).

2.4.5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil). Para a calibração da mensuração da POF foram realizadas três mensurações as quais foram submetidas ao Teste Kappa. Os dados da análise histológica e imunoistoquímica foram submetidos ao teste de Análise de Variância de Kruskal Wallis e pós teste de Dunn. Os dados de LT, FA e histométricos da POF foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, em seguida foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA) a um critério e o pós teste de Tukey. O nível de significância dos testes foi de $p \leq 0.05$.

3. Resultados

O poder do estudo foi calculado com os 156 animais e demonstrou-se com 95% de confiabilidade.

3.1. Análise dos Leucócitos Totais

Na análise intragrupo, ao comparar os diferentes períodos, os animais dos grupos SPE-5FU e PE-5FU, apresentaram queda significativa no número de LT entre o baseline e o período de 7 dias. Os animais dos grupos SPE-SS, SPE-CIS, PE-SS e PE-CIS não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os períodos (Figura 1A).

3.2. Análise da Fosfatase Alcalina

Na análise intragrupo, ao comparar os diferentes períodos, observou-se que os grupos SPE-CIS, SPE-5FU, PE-SS, PE-CIS e PE-5FU apresentaram queda significativa nos níveis de FA aos 3, 5 e 7 dias quando comparado ao baseline, entretanto, no grupo SPE-SS não houve diferença estatística (Figura 1B).

3.3. Análise Histológica

Com relação a intensidade de resposta inflamatória local e a extensão do processo inflamatório, o grupo controle (SPE-SS) apresentou-se com ausência de inflamação (Figura 2A, 2D). SPE-CIS e SPE-5FU apresentaram maior processo inflamatório comparado ao SPE-SS ($p \leq 0,05$), prevalecendo pequena quantidade de células inflamatórias e estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca (Figura 2B, 2C, 2E, 2F). PE-SS apresentou moderada quantidade de células inflamatórias estendendo-se por todo tecido conjuntivo da região de furca (Figura 3A,

3D). Houve maior intensidade e extensão do processo inflamatório nos grupos PE-SS, PE-CIS e PE-5FU comparado aos grupos SPE-CIS e SPE-5FU ($p \leq 0,05$). Além disso, o maior comprometimento dos tecidos periodontais ocorreu em PE-CIS e PE-5FU, com significativo aumento na intensidade e extensão do processo inflamatório comparado ao grupo PE-SS, apresentando grande quantidade de células inflamatórias e estendendo-se por todo tecido conjuntivo e ósseo da região de furca (Figura 3 B, C, E, F). Isso ocorreu em todos os períodos experimentais (Tabela 1).

A reabsorção radicular externa (cimento e dentina) e a reabsorção alveolar apresentaram-se ausentes e dentro dos padrões de normalidade respectivamente, nos grupos SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU (Figura 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F). Os maiores comprometimentos foram encontrados nos grupos PE-SS, PE-CIS e PE-5FU ($p \leq 0,05$); com muitas áreas de reabsorção externa ativa e grande quantidade de áreas de reabsorção óssea alveolar (Figura 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F). Isso ocorreu em todos os períodos experimentais (Tabela 2).

Com relação ao padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca, o grupo SPE-SS apresentou-se com moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso) (Figura 2A, 2D). Em SPE-CIS e SPE-5FU prevaleceu moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas (Figura 2B, 2C, 2E, 2F), apresentando-se mais desestruturados comparado ao grupo SPE-SS ($p \leq 0,05$). O grupo PE-SS apresentou-se com pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas e edema intersticial (Figura 3A, 3D). Os grupos PE-SS, PE-CIS e PE-5FU apresentaram-se mais desestruturados comparados aos grupos SPE-CIS e SPE-5FU ($p \leq 0,05$), sendo que PE-CIS e PE-5FU estavam mais comprometidos até mesmo que PE-SS ($p \leq 0,05$), apresentando desestruturação tecidual

severa com edema intersticial e áreas de necrose (Figura 3B, 3C, 3E, 3F). Isso ocorreu em todos os períodos experimentais (Tabela 3).

O padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca apresentou-se nos grupos SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU com trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea (Figura 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F). Um maior comprometimento foi encontrado nos grupos PE-SS, PE-CIS e PE-5FU comparados aos demais grupos ($p \leq 0,05$), prevalecendo áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos. Isso ocorreu em todos os períodos experimentais (Figura 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F) (Tabela 4).

3.4. Análise histométrica da porcentagem de osso na furca

O teste Kappa indicou alto nível de concordância nas medidas da POF intraexaminador de 94%.

Os resultados estão representados pela tabela 5. Nos animais dos grupos SPE-SS, SPE-CIS, SPE-5FU, a POF se manteve com uma porcentagem que condiz com a integridade do osso alveolar, não havendo perda óssea nesses grupos em todos os períodos experimentais.

Na análise intragrupo, observou-se que os grupos PE-SS, PE-CIS, PE-5FU apresentaram menor POF aos 7 dias quando comparados a 3 e 5 dias ($p \leq 0,05$) e os grupos PE-CIS e PE-5-FU apresentaram menor POF aos 5 dias quando comparado com 3 dias ($p \leq 0,05$).

Na análise intergrupo observou-se que os grupos PE-CIS e PE-FU apresentaram menor POF comparados ao grupo PE-SS aos 3, 5 e 7 dias ($p \leq 0,05$). O grupo PE-5FU apresentou menor POF comparado ao grupo PE-CIS aos 5 e 7 dias ($p \leq 0,05$).

3.5. Padrão de imunomarcção para TNF α , IL-1 β e RANKL

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de TNF α , IL-1 β e RANKL mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica. As células imunorreativas apresentaram uma coloração acastanhada confinada ao compartimento citossólico e em menor escala à matriz extracelular. A imunomarcção para TNF α e IL-1 β estava presente predominantemente em células inflamatórias e fibroblastos (Figura 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F). A marcação para RANKL estava presente predominantemente em osteoblastos (Figura 4G, 4H, 4I).

Os resultados estão representados na tabela 6 e na Figura 4. Para TNF α e IL-1 β prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção aos 3, 5 e 7 dias nos grupos SPE-SS. Aos 3, 5 e 7 para SPE-CIS e SPE-5FU prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção. Em PE-SS foi encontrado um moderado padrão de imunomarcção aos 3 e 7 dias e alto aos 5 dias. PE-CIS e PE-5FU apresentaram alto padrão de imunomarcção em todos os períodos experimentais.

Para RANKL prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção aos 3, 5 e 7 dias. PE-SS apresentou alto padrão de imunomarcção aos 3 e 5 dias e moderado aos 7 dias. PE-CIS e PE-FU apresentaram alto padrão de imunomarcção em todos os períodos experimentais.

Deste modo, na análise de TNF α e IL-1 β , foi encontrado maior padrão de imunomarcção para SPE-CIS, SPE-5FU, PE-SS, PE-CIS e PE-5FU comparado ao SPE-SS em todos os períodos experimentais ($p \leq 0.05$). No grupo PE-SS houve maior padrão de imunomarcção comparado com SPE-CIS e SPE-5FU aos 5 dias ($p \leq 0.05$). Para PE-CIS e PE-5FU houve maior padrão de imunomarcção comparado aos grupos SPE-CIS e SPE-5FU em todos períodos experimentais ($p \leq 0.05$). Além disso, um maior

padrão de imunomarcção foi encontrado em PE-CIS e PE-5FU comparado com PE-SS aos 3 e 7 dias ($p \leq 0.05$).

Para RANKL foi encontrado maior padrão de imunomarcção em PE-SS, PE-CIS e PE-5FU comparado aos demais grupos ($p \leq 0.05$). Além disso, PE-CIS e PE-5FU foram maiores que PE-SS aos 7 dias ($p \leq 0.05$).

4. Discussão

Para a indução da PE em roedores, a ligadura é o método mais utilizado na pesquisa periodontal (de Molon et al. 2014). Em ratos, a PE ocorre de maneira previsível após 7 dias (Rovin et al. 1966; Bezerra et al. 2002; Kuhr et al. 2004; de Almeida et al. 2007). Deste modo, Garcia et al. 2015 relataram que os quimioterápicos agravam a progressão da PE em períodos longos. Assim, avaliar os estágios iniciais do comprometimento periodontal torna-se importante para determinar o período de instalação da PE nos animais modificados sistemicamente com quimioterápicos.

No presente estudo, na análise sanguínea de LT, foi visto que os animais que receberam administração de 5-FU apresentaram leucopenia. Resultado semelhante foi observado por estudos anteriores (Branda et al. 2002; Eisold et al. 2002; Garcia et al. 2015). O hospedeiro leucopênico tem uma resposta imune deficiente frente a presença das bactérias, o que pode fazer com que ele seja mais suscetível à infecção periodontal (Rook 1988; Oyaizu et al. 2005). No entanto, nos grupos com administração de CIS e prevaleceu uma alta quantidade de LT, isso pode ter ocorrido pois os níveis de LT podem cair em períodos mais longos, uma vez que o período analisado foi de 7 dias.

Quanto a FA, sua baixa atividade no organismo resulta em uma entrada reduzida de cálcio e fosfato no esqueleto (Caswell et al. 1991), podendo causar alterações no osso alveolar marginal (Britknet et al. 1962; Beumer et al. 1973). No presente estudo, houve uma significativa redução nos níveis séricos de FA nos animais dos grupos SPE-CIS, SPE-5FU em todos períodos experimentais, corroborando outros estudos (Sorva et al. 1997; Crofton et al. 1998), onde o nível de FA do organismo diminuiu imediatamente com a administração de quimioterápicos. O mesmo ocorreu nos grupos com PE,

independentemente da administração dos quimioterápicos, pois a FA é um marcador bioquímico de osteoblastos comprometidos, assim estando intimamente ligado com a atividade osteoclástica (Nassar et al. 2009; Goes et al. 2012; de Menezes et al. 2012; Xian et al. 2006; Whyte 2010; Raghu Nadhanan et al. 2012; Novaes, 2013).

Com relação aos resultados histológicos, o grupo SPE-SS apresentou-se com ausência de inflamação. No entanto, os grupos SPE-CIS e SPE-5FU apresentaram maior intensidade da resposta inflamatória local (pequena quantidade de células inflamatórias), maior extensão do processo inflamatório (estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca), e pior padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca (moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas) comparados ao SPE-SS em todos os períodos experimentais.

Estes resultados nos grupos SPE-CIS e SPE-5FU podem ser explicados uma vez que os quimioterápicos são citotóxicos para células que possuem um alto índice de proliferação (Arias 2008). Outra possível justificativa é pelo fato dos quimioterápicos provocarem a degeneração autofágica nos queratinócitos da mucosa bucal (Von Bültzingslöwen et al. (2001). Sendo o epitélio juncional periodontal um tecido epitelial especializado, composto por queratinócitos, que apresentam um alto índice de renovação (Pöllänen et al. 2003) e por se tratar de uma linha de defesa dos tecidos periodontais contra a agressão microbiana (Tsukamoto et al. 2011), a ruptura do mesmo facilitaria a penetração de bactérias e seus subprodutos para o interior dos tecidos periodontais, especialmente aqueles que compõem o periodonto de inserção. Além do mais, deve ser considerado que o 5-FU promoveu uma severa leucopenia na fase inicial do tratamento, como observado no presente trabalho, o que reduz a capacidade de defesa do hospedeiro (Naidu et al. 2004; Garcia et al.2015).

Deste modo, frente a resposta inflamatória provocada pela ação dos quimioterápicos nos tecidos periodontais, as citocinas $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ quando produzidas em quantidade excessiva podem induzir mecanismos que culminam na reabsorção óssea, inibição da síntese do colágeno e ativação das metaloproteinases (MMPs), causando a destruição do tecido conjuntivo e do tecido ósseo (Graves & Cochran, 2003; Graves, 2008), além do mais, produzem $IL-6$ e $IL-11$ que por sua vez voltam a mediar a produção de $IL-1\beta$ e $TNF\alpha$, podendo exacerbar a resposta inflamatória (Hillmann, Hillmann & Geursten, 1995; Manolagas, 1995; Yucel-Lindberg, Lerner & Modéer, 1995).

No presente estudo, ao analisar os tecidos periodontais, foi visto moderado padrão de imunomarcção para $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ no SPE-CIS e SPE-5FU em todos os períodos experimentais, correspondendo assim ao pequeno processo inflamatório encontrado. Para RANKL, que controla a reabsorção óssea através da indução de osteoclastogênese e da ativação de osteoclastos, prevaleceu baixo padrão de imunomarcção aos 3, 5 e 7 dias nos grupos SPE-CIS e SPE-5FU assim como no SPE-SS. Isso demonstra que nos grupos onde os animais foram tratados com os quimioterápicos sem indução da PE, apesar de ter ocorrido alterações histopatológicas (processo inflamatório), não foi observado alterações no metabolismo ósseo determinadas pela proteínas RANKL, permitindo-se concluir que na ausência da placa bacteriana, as alterações sistêmicas causadas pelos quimioterápicos, quando administrado na dosagem utilizada no presente estudo, ainda não foram suficientes para promover alterações na POF corroborando com os resultados encontrados por Garcia et al. 2015.

Com relação aos grupos PE-SS, PE-CIS e PE-5FU, piores resultados histológicos foram encontrados em comparação aos grupos SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU, em todos os parâmetros. Além do mais, PE-CIS e PE-5FU apresentaram maior intensidade da resposta inflamatória local (grande quantidade de células inflamatórias), maior extensão

do processo inflamatório (estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca) e pior padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca (desestruturação tecidual severa com edema intersticial e áreas de necrose) comparado ao PE-SS em todos os períodos experimentais. Isso pode explicar o alto padrão de imunomarcação encontrado para TNF α e IL-1 β aos 3 e 7 dias em PE-CIS e PE-5FU quando comparado ao PE-SS. Estes resultados mostram que quimioterápicos agravaram a severidade do processo inflamatório, o que poderia explicar os menores valores observados da POF, uma vez que TNF α e IL-1 β estimulam a produção de RANKL, aumentando a reabsorção óssea através de uma via autócrina e parácrina (Tani-ishi et al. 1999; Kwan et al. 2004).

Assim, RANKL mostrou-se com maior padrão de imunomarcação em PE-CIS e PE-5FU aos 7 dias comparados ao grupo PE-SS. Por outro lado, não houve diferença estatística nos períodos anteriores. A reabsorção óssea nos períodos de 3 e 5 dias pode ter ocorrido por mecanismos independentes de RANKL, uma vez que TNF α , IL-6 e fatores de crescimento, tais como Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β), podem induzir a formação de osteoclastos e conseqüentemente ocorrer a osteoclastogênese sob condições inflamatórias (Lau et al. 2007; O'Brien et al. 2016). Outras citocinas como APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II também podem induzir a osteoclastogênese independente de RANKL (Hemingway et al. 2011). Dessa forma, nos grupos PE-CIS e PE-5FU, foi encontrado menor POF comparado ao PE-SS em todos períodos experimentais. Além disso, PE-5FU apresentou menor POF até mesmo comparado ao PE-CIS aos 5 e 7 dias.

Sobre a ação dos quimioterápicos nos animais que tiveram a PE induzida, os resultados corroboram com o estudo de Garcia et al. 2015 e Theodoro et al. 2016, onde os quimioterápicos agravaram a PE induzida em ratos, porém, no presente estudo, em

períodos mais curtos. Além disso, foi demonstrado que a aplicação dos quimioterápicos exacerba a resposta inflamatória nos tecidos periodontais, assim animais com a PE induzida tiveram rápida e intensa destruição óssea nos períodos iniciais, o que resultou nas áreas de necrose frequentemente encontradas e reabsorções radiculares externas, uma vez que a reabsorção radicular externa dos dentes pode ocorrer como resultado das condições inflamatórias do ligamento periodontal (Pindborg 1970, Bakland 1992; Almeida et al. 2008; Garcia et al. 2015; Theodoro et al. 2016).

Extrapolando esses resultados para humanos, de acordo com nosso estudo pré-clínico, podemos inferir que os quimioterápicos podem agravar a progressão e severidade da DP imediatamente após o início do seu tratamento, entretanto, outros estudos em humanos são necessários para confirmar esses resultados. Além disso, cuidados bucais em pacientes que serão submetidos ao tratamento com quimioterápicos se tornariam ainda mais relevantes, uma vez que a DP poderia progredir de maneira mais severa.

Assim, diante dos limites do presente estudo, pode-se concluir que os quimioterápicos promoveram uma exacerbação do processo inflamatório nos tecidos periodontais saudáveis e agravaram a progressão da PE em seu estágio inicial.

Agradecimentos

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de São Paulo – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade de São Paulo-UNESP, Araçatuba, São Paulo. À Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio à pesquisa recebido pelo Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida (Processo FAPESP 2014/11427-8).

Referências Bibliográficas

- Aguiar, J.C., Gomes, E.P., Fonseca-Silva, T., Velloso, N.A., Vieira, L.T., Fernandes, M.F., Santos, S.H., Neto, J.F., De-Paula, A.M., Guimarães, A.L. (2013) Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. *Journal of Periodontal Research* **48**, 632-637.
- Alani, A. & Seymour, R. (2014) Systemic medication and the inflammatory cascade. *Periodontology 2000* **64**, 198–210.
- Al-Mahalawy, H., Marei, H.F., Abuhashish, H., Alhawaj, H., Alrefae, M., Al-Jandan, B. (2016) Effects of cisplatin chemotherapy on the osseointegration of titanium implants. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* **44**, 337-346.
- Araújo, A.A., Souza, G.L., Souza T.O., Brito, G.A.C., Aragão, K.S., Medeiros, C.A.X., Lourenço, Y., Alves, M. S. C. F. A., Araújo Júnior, R.F. (2013) Olmesartan decreases IL-1 β and TNF- α levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **386**, 875-884.
- Arias, J.L. (2008) Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. *Molecules* **13**, 2340-2369.
- Bakland, L.K. (1992) Root resorption. *Dental Clinics of North America* **36**, 491-507.
- Beumer, J., Trowbridgl, H.O., Silverman, S., Eisenberg, E. (1973) Childhood hypophosphatasia and the premature loss of teeth. A clinical and laboratory study of .seven cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* **35**, 631-640.

- Bezerra, M.M., Brito, G.A., Ribeiro, R.A., Rocha, F.A. Lowdose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Brazilian journal of medical and biological research* **35**, 613-616.
- Branda, R.F., Chen, Z., Brooks, E.M., Naud, S.J., Trainor, T.D., McCormack, J.J. (2002) Diet modulates the toxicity of cancer chemotherapy in rats. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **140**, 358-368.
- Britkner, R.J., Rickles, N.H. & Porter, D.R. (1962) Hypophosphatasia with premature shedding of teeth and aplasia of cementum. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* **15**, 1351-1369.
- Caswell, A.M., Whvte, M.P. & Russell, R.G.G. (1991) Hypophosphatasia and the extracellular metabolism of inorganic pyrophosphate: clinical and laboratory aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **28**, 175-232.
- Chang, C.T., Ho, T.Y., Lin, H., Liang, J.A., Huang, H.C., Li, C.C., Lo, H.Y., Wu, S.L., Huang, Y.F., Hsiang, C.Y. (2012) 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One* **7**, e31808.
- Choi, Y.J., Lee, S.H., Lee, J.L., Ahn, J.H., Lee, K.H., You, D., Hong, B., Hong, J.H., Ahn, H. (2015) Phase II study of pemetrexed in combination with cisplatin in patients with advanced urothelial cancer: the PECULIAR study (KCSG 10-17). *British Journal of Cancer* **112**, 260-265.
- Cochran, D.L. (2008) Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology* **79**, 1569-1576.
- CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2015) Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em

atividades de ensino ou pesquisa. Disponível em: <
http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em: 12/01/2017.

Crofton, P.M., Ahmed, S.F. & Wade, J.C., Stephen, R., Elmlinger, M.W., Ranke, M.B., Kelnar, C.J.H., Wallace, W.H.B. (1998) Effects of intensive chemotherapy on bone and collagen turnover and the growth hormone axis in children with acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**, 3121–3129.

de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Oshiiwa, M., Garcia, V.G. (2007) Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology* **78**, 566-575.

de Menezes, A.M., de Souza, G.F., Gomes, A.S., de Carvalho Leitão, R.F., Ribeiro, R. de A, de Oliveira, M.G. & de Castro Brito, G.A. (2012) S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology* **83**, 514-521.

de Molon, R.S., de Avila, E.D., Boas Nogueira, A.V., Chaves de Souza, J.A., Avila-Campos, M.J., de Andrade, C.R., Cirelli, J.A. (2014) Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *Journal of Periodontology* **85**, 465-477.

Dosseva-Panova, V.T., Popova, C.L., Panov, V.E. (2014) Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. *Folia medica* **56**, 152-160.

Du Bois, D. & Du Bois, E.F. (1989) A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Nutrition* **17**, 303-311.

Eisold, S., Dihlmann, S., Linnebacher, M., Ryschich, E., Aulmann, M., Schmidt, J., Schlehofer, J.R., Ridder, R., Von Knebel Doeberitz, M. (2002) Prevention of

- chemotherapy-related toxic side effects by infection with adeno-associated virus type 2. *International Journal of Cancer* **100**, 606-614.
- Fang, S.B., Shih, H.Y., Huang, C.H., Li, L.T., Chen, C.C., Fang, H.W. (2014) Live and heatkilled *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. *Supportive Care in Cancer* **22**, 1647-1654.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. (2000) Schalm's veterinary hematology. 5th edition, p.1344, Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.
- Food and Drug Administration. Dose Calculator. Conversion Chemotherapy of Human to Animals. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- Garcia, V.G., Knoll, L.R., Longo, M., Novaes, V.C., Assem, N.Z., Ervolino, E., de Toledo, B.E., Theodoro, L.H. (2016) Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research* **51**, 26-37.
- Garcia, V.G., Novaes, V.C., De Almeida J.M., Longo, M., Ervolino, E., Bomfim, S.R., Theodoro, L.H. (2015) Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Supportive Care in Cancer*. **23**, 2007-2017.
- Goes, P., Melo, I.M., Dutra, C.S., Lima, A.P. & Lima, V. (2012) Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Archives of Oral Biology* **57**, 1537-1544.
- Gomes, E.P., Aguiar, J.C., Fonseca-Silva, T., Dias, L.C., Moura-Boas, K.P., Roy, A., Velloso, N.A., Rodrigues-Neto, J.F., De-Paula, A.M., Guimarães, A.L. (2013) Diazepam reverses the alveolar bone loss and hippocampal interleukin-1beta and

- interleukin-6 enhanced by conditioned fear stress in ligature-induced periodontal disease in rats. *Journal of Periodontal Research*. **48**, 151-158.
- Graves, D. (2008) Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **79**, 1585–1591.
- Graves, D.T. & Cochran, D. (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **74**, 391–401.
- Guchelaar, H.J., Vermes, I., Koopmans, R.P., Eutelingsperger, C.P., Haanen, C. (1998) Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **42**, 77-83.
- Guggenheimer, J., Verbin, R.S., Appel, B.N., Schmutz, J. (1977) Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* **44**, 58-63.
- Half, E. & Arber, N. (2009) Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **10**, 211-209.
- Havelka, A.M., Berndtsson, M., Olofsson, M.H., Shoshan, M.C., Linder S. (2007) Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **7**, 1035-1039.
- Hemingway, F., Taylor, R., Knowles, H.J., Athanasou, N.A. (2011) RANKL-independent human osteoclast formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II. *Bone*. **48**, 938-944.
- Hillmann, G., Hillmann, B. & Geursten, W. (1995) Immunohistological determination of interleukin-1 beta in inflamed gingival epithelium. *Archives of Oral Biology* **40**, 353-359.

- Johnson, J.H. (1975) Effects of local irritation and dextran and sulphat administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research* **10**, 332-345.
- Kayal, R.A. (2013) The role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed Research International* **2013**, 1-12.
- Kim, S.S., Jackson-Boeters, L., Darling, M.R., Rieder, M.J., Hamilton, D.W. (2013) Nifedipine induces periostin expression in gingival fibroblasts through TGF-beta. *Journal of Dental Research* **92**, 1022-1028.
- Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C., Kocher, T. (2004) Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal of periodontal research* **39**, 101-106.
- Kwan Tat S1, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine and growth factor reviews*. **15**, 49-60.
- Lau, Y.S., Danks, L., Sun, S.G., Fox, S., Sabokbar, A., Harris, A., Athanasou, N.A. (2007) RANKL-dependent and RANKL-independent mechanisms of macrophage osteoclast differentiation in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **105**, 7-16.
- Linardou, H., Pentheroudakis, G., Varthalitis, I., Gogas, H., Pectasides, D., Makatsoris, T., Fountzilas, G., Bafaloukos, D. (2015) Predictive biomarkers to chemotherapy in patients with advanced melanoma receiving the combination of cisplatin--vinblastine--temozolomide (PVT) as first-line treatment: a study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HECOG). *Anticancer Research* **35**, 1105-1113.
- Logan, R.M., Stringer, A.M., Bowen, J.M., Yeoh, A.S., Gibson, R.J., Sonis, S.T., Keefe, D.M. (2007) The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced

- alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews* **33**, 448-460.
- Lorch, J.H., Goloubeva, O., Haddad, R.I., Cullen, K., Sarlis, N., Tishler, R., Tan, M., Fasciano, J., Sammartino, D.E., Posner, M.R., TAX 324 Study Group. (2011) Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. **12**, 153-9.
- Manolagas, S.C. (1995) Role of cytokines in bone resorption. *Bone* **17**, 635-675.
- Maring, J.G., Van Kuilenburg, A.B.P., Haasjes, J., Piersma, H., Groen, H.J.M., Uges D.R.A., Van Gennip A.H., De Vries, E.G.E. (2002) Reduced 5-FU clearance in a patient with low DPD activity due to heterozygosity for a mutant allele of the DPYD gene. *British Journal of Cancer* **86**, 1028–1033.
- Mcguire, D.B. (2002) Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than muscositis and mouthwash. *Cancer Practice* **10**, 179-91.
- Mihai, R. (2015) Diagnosis, treatment and outcome of adrenocortical cancer. *The British Journal of Surgery* **102**, 291-306.
- Miller, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G., Reeves, W.B. (2010) Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* **2**, 2490-2518.
- Naidu, M.U., Ramana, G.V., Rani, P.U., Mohan, I.K., Suman, A., Roy, P. (2004) Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. *Neoplasia* **6**, 423-431.
- Nakasato, T., Izumisawa, M., Akahane, A., Kikuchi, K., Ehara, S., Shoji, S., Kogi, S., Mizuki, H., Sugiyama, Y. (2012) Combined intra-arterial infusion and systemic

- chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Japanese Journal of Radiology* **30**, 752-761.
- Nakib, N. & Ashrafi, S.S. (2011) Drug-induced gingival overgrowth. *Disease-a-month*. **57**, 225-230.
- Nassar, P.O., Nassar, C.A.; Guimarães, M.R., Aquino, S.G., Andia, D.C., Muscara, M.N., Spolidorio, D.M., Rossa, C.JR., Spolidorio, L.C. (2009) Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research* **44**, 479-488.
- NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *The Journal of physiology* **588**, 2519-2521.
- Novaes, VCN. Influência do 5-fluorouracil nos tecidos periodontais normais e sobre a evolução da doença periodontal experimental induzida. 2013.114 f. Dissertação (mestrado em periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba , 2004.
- O'Brien, W., Fissel, B.M., Maeda, Y., Yan, J., Ge, X., Gravallesse, E.M., Aliprantis, A.O., Charles JF. (2016) RANK-Independent Osteoclast Formation and Bone Erosion in Inflammatory Arthritis. *Arthritis & rheumatology* **68**, 2889-2900.
- Oyaizu, K., Mineshiba, F., Mineshiba, J., Takaya, H., Nishimura, F., Tanimoto, I., Arai, H., Takashiba, S. (2005) Periodontal treatment in severe aplastic anemia. *Journal of Periodontology* **76**, 1211-1216.
- Ozkok, A. & Edelstein, C.L. (2014) Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *BioMed Research International* **2014**, 967826.

- Pang, S.K., Yu, C.W., Au-Yeung, S.C.F., Ho, Y.P. (2007) DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **363**, 235–240.
- Pindborg, J, J. (1970) Pathology of the hard dental tissues, pp, 326-344, W, B, Saunders, Philadelphia.
- Pöllänen, M.T., Salonen, J.I., Uitto, V.J. (2003) Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontology 2000* **31**, 12-31.
- Preshaw, P.M. (2013) Oral contraceptives and the periodontium. *Periodontology 2000* **61**, 125-159.
- Raghu Nadhanan, R., Abimosleh, S.M., Su, Y.W., Scherer, M.A., Howarth, G.S., Xian, C.J. (2012) Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism* **302**, 1440-1449.
- Root, R.K. The compromised host. In: Wyngaarden JB, ed. Cecil Textbook of Medicine, 18th ed. Philadelphia: Saunders; 1988, 1535.
- Rovin, S., Costich, E.R., Gordon, H.A. (1966) The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *Journal of periodontal research* **1**, 193-204.
- Saltz, L.B. & Kemeny, N.E. (1996) Adjuvant Chemotherapy of Colorectal Cancer. *The Oncologist* **1**, 22-29.
- Seymour, R.A. (2006) Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000* **40**, 120-129.
- Sorva, R., Kivivuori, S.M., Turpeinen, M., Marttinen, E., Risteli, J., Risteli, L., Sorva, A., Siimes, M.A. (1997) Very low rate of type I collagen synthesis and degradation in newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukaemia. *Bone* **20**, 139–143.

- Spolidorio, L.C., Nassar, P.O., Nassar C.A., Spolidorio, D.M., Muscara, M.N. (2007) Conversion of immunosuppressive monotherapy from cyclosporin A to tacrolimus reverses bone loss in rats. *Calcified Tissue International* **81**, 114–123.
- Surendiran, A., Balamurugan, N., Gunaseelan, K., Akhtar, S., Reddy, K.S., Adithan, C. (2010) Indian Adverse drug reaction profile of cisplatin-based chemotherapy regimen in a tertiary care hospital in India: An evaluative study. *Indian Journal of Pharmacology* **42**, 40-43.
- Tani-ishii, N., Tsunoda, A., Teranaka, T., Umemoto, T. (1999) Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1” and TNF alpha. *Journal of dental research* **78**, 1617-1623.
- Taylor, S.G. 4TH., Murthy, A.K., Vannetzel, J.M., Colin, P., Dray, M., Caldarelli, D.D., Shott, S., Vokes, E., Showel, J.L., Hutchinson, J.C., et al. (1994) Randomized comparison of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil infusion followed by radiation versus concomitant treatment in advanced head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology* **12**, 385-395.
- Theodoro, L.H., Longo, M., Ervolino, E., Duque, C., Ferro-Alves, M.L., Assem, N.Z., Louzada, L.M., Garcia, V.G. (2016) Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. *Journal of Periodontal Research* **51**, 669-680.
- Tsukamoto, Y., Usui, M., Yamamoto, G., Takagi, Y., Tachikawa, T., Yamamoto, M., Nakamura, M. (2012) Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *Journal of Periodontal Research* **47**, 750-757.
- Van Kuilenburg, A.B., Meinsma, R., Zonnenberg, B.A., Zoetekouw, L., Baas, F., Matsuda, K., Tamaki, N., Van Gennip, A.H. (2003) Dihydropyrimidinase

- deficiency and severe 5-fluorouracil toxicity. *Clinical Cancer Research* **9**, 4363-4367.
- Vermorken, J.B., Peyrade, F., Krauss, J., Mesía, R., Remenar, E., Gauler, T.C., Keilholz, U., Delord, J.P., Schafhausen, P., Erfán, J., Brümmendorf, T.H., Iglesias, L., Bethe, U., Hicking, C., Clement, P.M. (2014) Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Annals of oncology* **25**, 682-688.
- Von Bültzingslöwen, I., Jontell, M., Hurst, P., Nannmark, U., Kardos, T. (2001) 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. *Oral Oncology* **37**, 537-544.
- Wang, D. & Lippard, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **4**, 307-320.
- Whyte MP. (2010) Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1192**, 190-200.
- Xian, C.J., Cool, J.C., Pyragius, T., Foster, B.K. (2006) Damage and recovery of the bone growth mechanism in young rats following 5-fluorouracil acute chemotherapy. *Journal of Cellular Biochemistry* **99**, 1688-1704.
- Yucel-Lindberg, T., Lerner, U.H. & Modéer, T. (1995) Effects and interactions of tumour necrosis factor α and bradykinin on interleukin-1 production in gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research* **30**, 186-191.

Zhang, J., Liu, L., Gong, Y., Zheng, X., Yang, M., Cui, J., Shen, S. (2009) Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum(II) complexes. *European journal of medicinal chemistry* **44**, 2322-2327.

Relevância Clínica

Fundamentação para o estudo: O impacto da CIS e do 5-FU sobre o periodonto ainda não está elucidado. Um modelo animal pode auxiliar a avaliar o efeito do 5-FU e da CIS sob os tecidos periodontais saudáveis e durante os estágios iniciais da PE induzida em ratos. **Principais conclusões:** Ambos quimioterápicos promoveram uma exacerbação do processo inflamatório nos tecidos periodontais saudáveis e agravaram a progressão da PE em seu estágio inicial. **Implicações práticas:** O controle de placa bacteriana em pacientes submetidos à quimioterapia se torna ainda mais importante uma vez que a doença pode progredir mais rápido.

Tabela 1 – Análise histológica da intensidade da resposta inflamatória local e extensão do processo inflamatório de acordo com escores, grupos e períodos.

ANÁLISE HISTOLÓGICA																			
ESCORE PARA CADA PARÂMETRO		PORCENTAGEM DE ANIMAIS POR ESCORE GRUPOS EXPERIMENTAIS																	
		SPE-SS			SPE-CIS			SPE-5FU			PE-SS			PE-CIS			PE-5FU		
		3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL																			
(0) ausência de inflamação		100	100	100	20	20	20	20	20	20									
(1) pequena quantidade de células inflamatórias					80	80	80	80	80	80									
(2) moderada quantidade de células inflamatórias											80	80	80						
(3) grande quantidade de células inflamatórias											20	20	20	100	100	100	100	100	100
Mediana e análise intergrupo		0	0	0	1*	1*	1*	1*	1*	1*	2*	2*	2*	3*	3*	3*	3*	3*	3*
											†	†	†	‡	‡	‡	‡	‡	‡
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO																			
(0) ausência de inflamação		100	100	100	20	20	20	20	20	20									
(1) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca					80	80	80	80	80	80									
(2) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca											80	80	80						
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca											20	20	20	100	100	100	100	100	100
Mediana e análise intergrupo		0	0	0	1*	1*	1*	1*	1*	1*	2*	2*	2*	3*	3*	3*	3*	3*	3*
											†	†	†	‡	‡	‡	‡	‡	‡

*Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa com SPE-CIS e SPE-5FU no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

‡ Diferença estatisticamente significativa com PE-SS no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 - Análise histológica da intensidade da reabsorção radicular externa (cimento e dentina) e reabsorção óssea alveolar de acordo com escores, grupos e períodos

ANÁLISE HISTOLÓGICA																		
ESCORE PARA CADA PARÂMETRO	GRUPOS EXPERIMENTAIS																	
	PROCENTAGEM DE ANIMAIS POR ESCORE																	
	SPE-SS			SPE-CIS			SPE-5FU			PE-SS			PE-CIS			PE-5FU		
	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D
REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA (CEMENTO E DENTINA)																		
(0) ausente	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
(1) apenas área reabsorvidas inativas													40	40	40	20	20	20
(2) poucas áreas de reabsorção ativas													60	60	60	80	80	100
(3) muitas áreas de reabsorção ativas																		
Mediana e análise intergrupo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
										#	#	#	#	#	#	#	#	#
REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR																		
(0) dentro dos padrões de normalidade	100	100	100	100	100	80	100	80	80									
(1) pequena quantidade de áreas de reabsorção						20		20	20									
(2) moderada quantidade de áreas de reabsorção										40	40	20	20	20			20	
(3) grande quantidade de áreas de reabsorção										60	60	80	80	80	100	80	100	100
Mediana e análise intergrupo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
										#	#	#	#	#	#	#	#	#

#Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 - Análise histológica do padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca de acordo com escores, grupos e períodos.

ANÁLISE HISTOLÓGICA																			
ESCORE PARA CADA PARÂMETRO	GRUPOS EXPERIMENTAIS E PORCENTAGEM DE ANIMAIS POR ESCORE																		
	SPE-SS			SPE-CIS			SPE-5FU			PE-SS			PE-CIS			PE-5FU			
	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA																			
(0) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	100	100	100	40	40	20	20	40	40										
(1) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas				60	60	80	80	60	60										
(2) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas e edema intersticial										100	100	80	40	40	20	20	40	20	
(3) desestruturação tecidual severa com edema intersticial e áreas de necrose												20	60	60	80	80	60	80	
Mediana e análise intergrupo	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
										†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
													‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡

* Diferença estatisticamente significante com SPE-SS no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significante com SPE-CIS e SPE-5FU no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

‡ Diferença estatisticamente significante com PE-SS no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 - Análise histológica do padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca de acordo com escores, grupos e períodos.

ANÁLISE HISTOLÓGICA																		
ESCORE PARA CADA PARÂMETRO	GRUPOS EXPERIMENTAIS E PORCENTAGEM DE ANIMAIS POR ESCORE																	
	SPE-SS			SPE-CIS			SPE-5FU			PE-SS			PE-CIS			PE-5FU		
	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D	3D	5D	7D
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR DA REGIÃO DE FURCA																		
(0) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	100	100	100	100	100	80	100	80	80									
(1) trabéculas ósseas de contorno irregular recobertas tanto por muitos osteoblastos quanto por osteoclastos ativos						20		20	20									
(2) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos										40	40	20	20	20			20	
(3) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos										60	60	80	80	80	100	80	100	100
Mediana e análise intergrupo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
										#	#	#	#	#	#	#	#	#

Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

Tabela 5: Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos da POF (%) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.

Grupos						
Período	SPE-SS	SPE-CIS	SPE-5FU	PE-SS	PE-CIS	PE-5FU
3 dias	82,00 ± 2,47	81,01 ± 1,86	81,35 ± 0,71	74,67 ± 2,72	69,04 ± 3,40 ‡	70,38 ± 3,31 ‡
5 dias	82,76 ± 2,14	84,66 ± 2,55	82,06 ± 1,48	72,06 ± 3,06	59,30 ± 5,56 †‡	52,34 ± 6,83 †‡#
7 dias	84,30 ± 1,82	84,38 ± 2,41	81,89 ± 1,42	66,70 ± 2,50*	49,02 ± 9,96 *‡	31,87 ± 9,94 *‡#

Comparação intragrupo:

* Diferença estatisticamente significativa com 3 e 5 dias no mesmo grupo. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa somente com 3 dias no mesmo grupo. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Comparação intergrupo:

‡ Diferença estatisticamente significativa com PE-SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 6 – Porcentagem do padrão de imunomarcção para TNF α , IL-1 β e RANKL de acordo com cada grupo e período.

Tempo	Grupos	TNF α				Mediana	IL-1 β				Mediana	RANKL				Mediana
		Escores					Escores					Escores				
		0	1	2	3		0	1	2	3		0	1	2	3	
3 dias	SPE-SS	100				1	100				1	100				1
	SPE-CIS	16,6	83,4			2*	16,6	83,4			2*	100				1
	SPE-5FU			100		2*			100			100				1
	PE-SS			83,4	16,6	2*			83,4	16,6			33,4	66,6		3 [#]
	PE-CIS				100	3 ^{*†‡}				100				100		3 [#]
	PE-5FU				100	3 ^{*†‡}				100				100		3 [#]
5 dias	SPE-SS	100				1	100				1	100				1
	SPE-CIS	16,6	83,4			2*			100			100				1
	SPE-5FU	16,6	83,4			2*	16,6	83,4			2*	100				1
	PE-SS				100	3 ^{*†}				100			33,4	66,6		3 [#]
	PE-CIS				100	3 ^{*†}				100				100		3 [#]
	PE-5FU				100	3 ^{*†}				100				100		3 [#]
7 dias	SPE-SS	100				1	100				1	100				1
	SPE-CIS	16,6	83,4			2*	16,6	83,4			2*	100				1
	SPE-5FU	16,6	83,4			2*	16,6	83,4			2*	100				1
	PE-SS			66,6	33,4	2*			66,6	33,4			83,4	16,6		2 [#]
	PE-CIS				100	3 ^{*†‡}				100				100		3 ^{#‡}
	PE-5FU				100	3 ^{*†‡}				100				100		3 ^{#‡}

Comparação intergrupo:

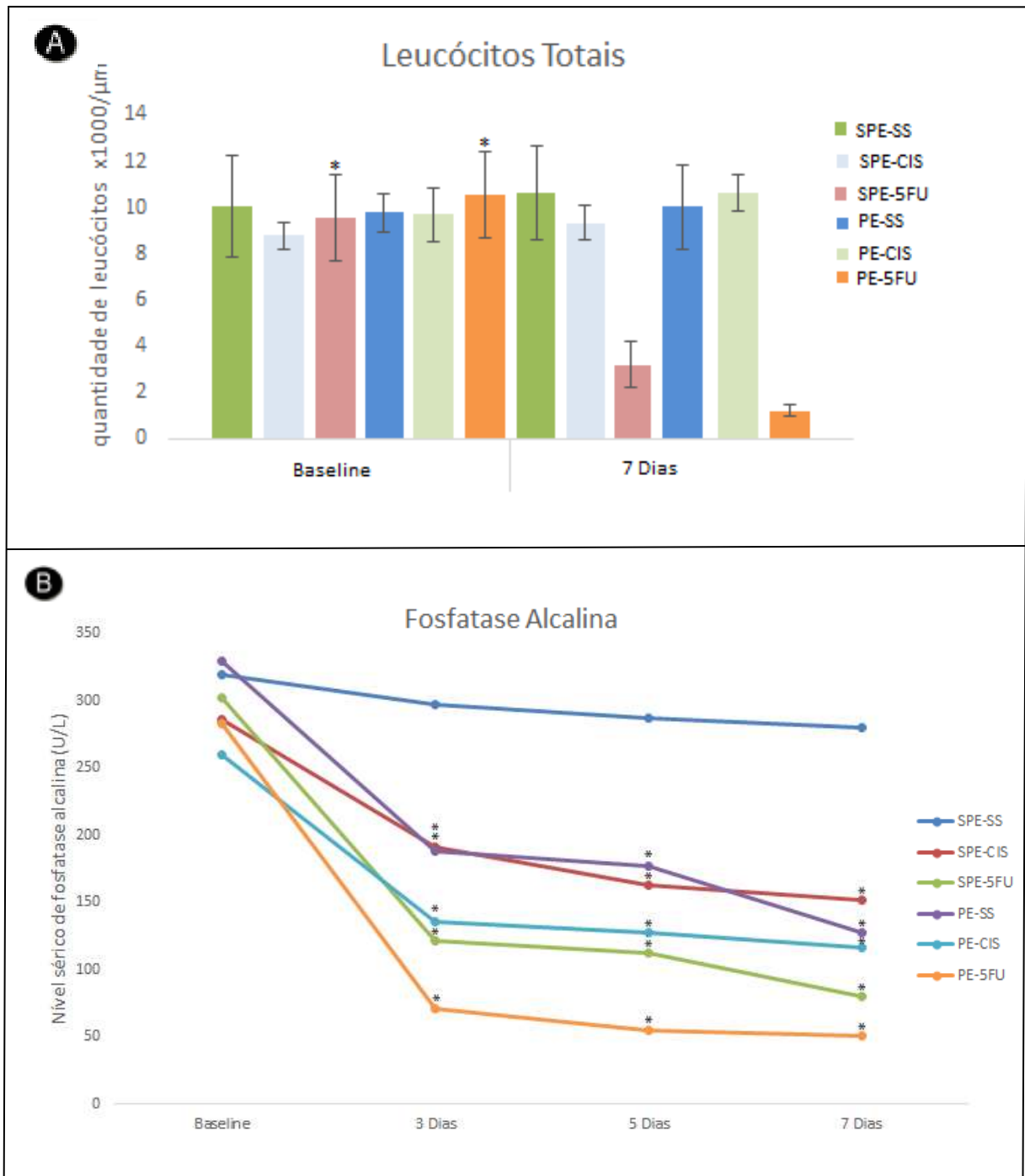
*Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa com SPE-CIS e SPE-5FU no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

‡ Diferença estatisticamente significativa com PE-SS no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

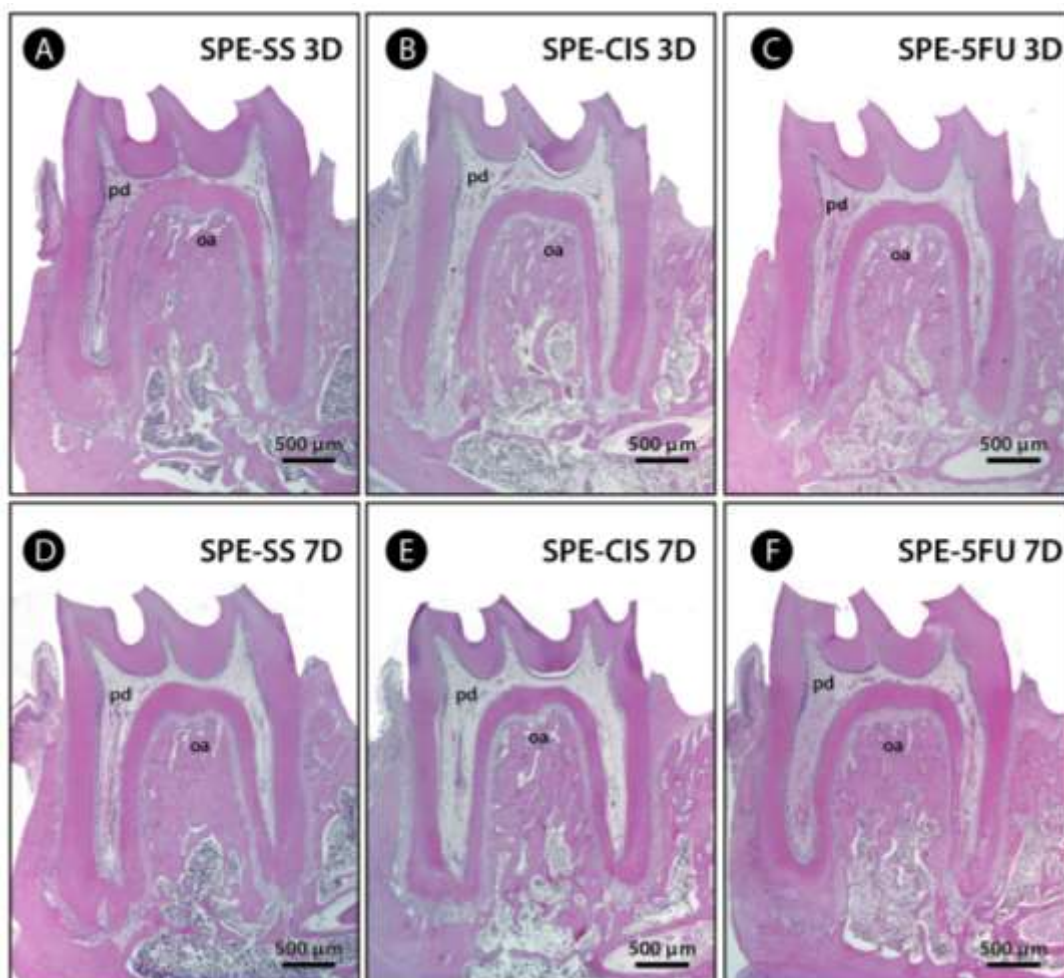
#Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU e no mesmo período. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

Figura 1



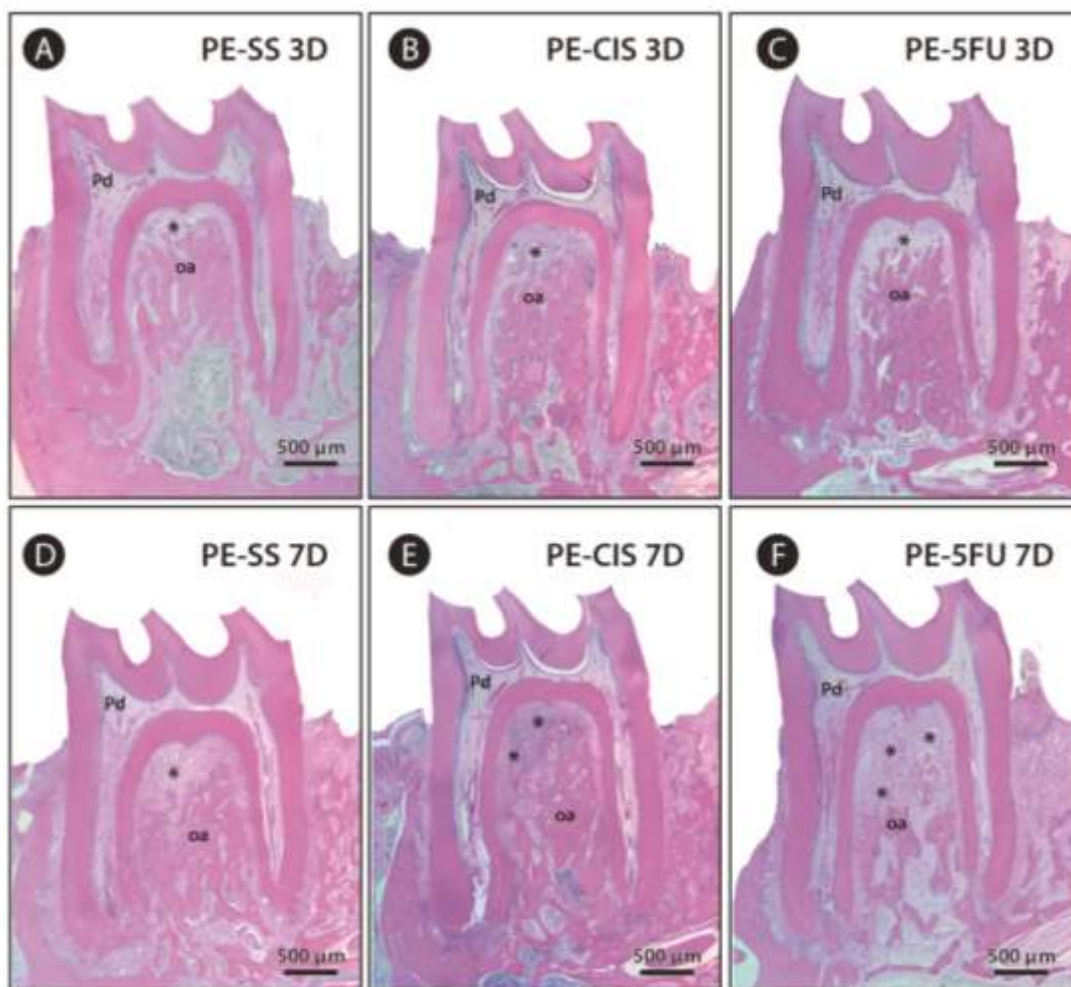
Gráficos mostrando: **A**: número de leucócitos totais no sangue em cada grupo experimental nos períodos do baseline e 7 dias. *Diferença estatisticamente significativa com 7 dias. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0.05$) **B**: níveis séricos da fosfatase alcalina em cada grupo experimental nos períodos do baseline, 3, 5 e 7 dias. *Diferença estatisticamente significativa com Baseline. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 2



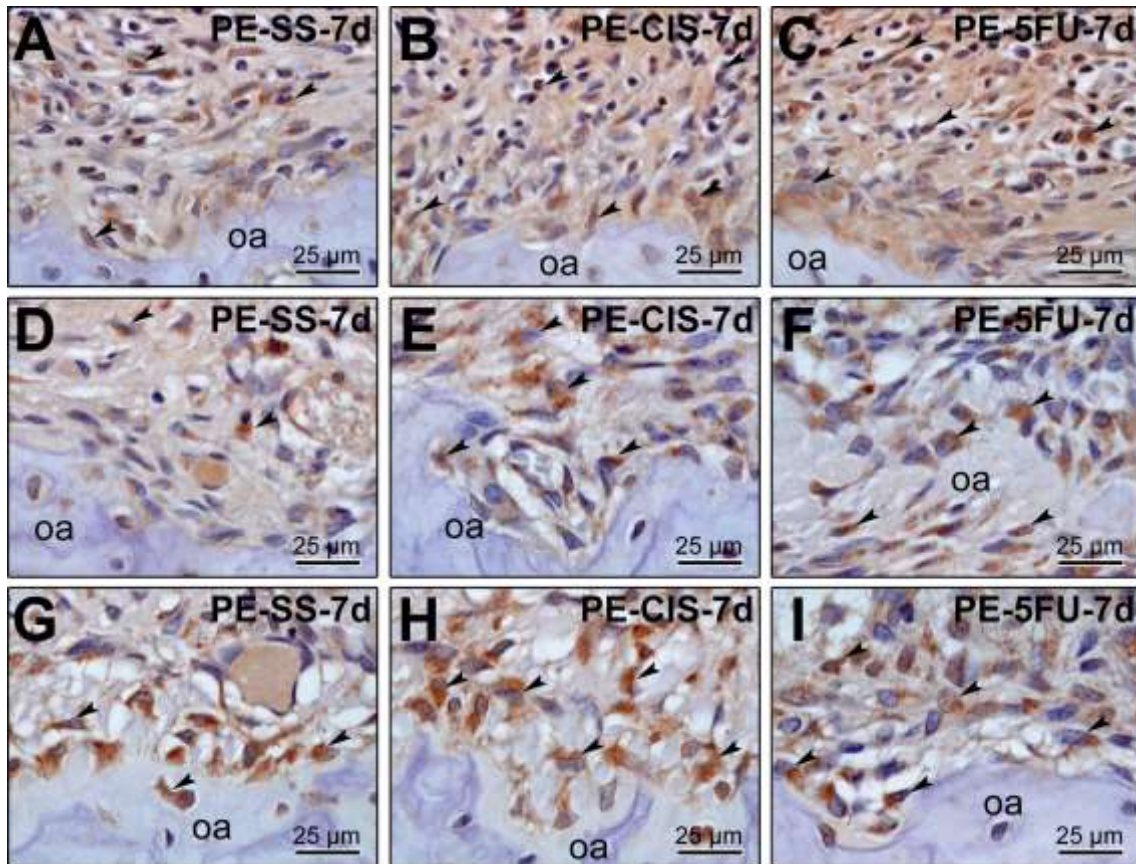
Fotomicrografia evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior de ratos modificados sistemicamente por quimioterápicos sem periodontite experimental (SPE) nos períodos de 3 e 7 dias. A e D: A porcentagem de osso na furca (POF) e a magnitude da resposta inflamatória expressam um quadro de normalidade periodontal em ratos que receberam administração de solução salina. **B, E, C e F:** A pequena quantidade de células inflamatórias expressam um quadro de inflamação periodontal sem alteração na POF em ratos que receberam administração de Cisplatina e 5 Fluorouracil. Abreviações: pd: polpa dental; oa: osso alveolar. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 µm.

Figura 3



Fotomicrografia evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior de ratos modificados sistemicamente por quimioterápicos e com periodontite experimental (PE) induzida nos períodos de 3 e 7 dias. A e D: Animais que receberam administração de solução salina (SS). A porcentagem de osso na furca (POF) e a magnitude da resposta inflamatória expressam menor comprometimento periodontal em ratos que receberam administração de SS em comparação com ratos modificados sistemicamente por quimioterápicos. **B e E:** Animais que receberam administração de Cisplatina (CIS). A POF e a magnitude da resposta inflamatória expressam maior severidade da PE em ratos que receberam administração de CIS em comparação ao grupo PE-SS aos 3 e 7 dias. **C e F:** Animais que receberam administração de 5 Fluorouracil (5-FU). A POF e a magnitude da resposta inflamatória expressam maior severidade da PE em ratos que receberam administração de 5-FU em comparação ao grupo PE-SS aos 3 e 7 dias e em comparação ao grupo PE-CIS aos 7 dias. Abreviações: oa: pd: polpa denta; oa: osso alveolar; *: processo inflamatório. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 μ m.

Figura 4



Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TNF α (A-C), IL-1B (D-F) e RANKL (G-I) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental (PE) induzida no período de 7 dias: A, D, G: Grupo PE-SS aos 7; B, E, H: Grupo PE-CIS aos 7 dias; C, F, I: Grupo PE-5-FU aos 7 dias; Contra-coloração: Hematoxilina. Barras de escala 25 μ m.

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico**", Processo FOA nº 2015-00590, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Agosto de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 03 de Outubro de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Novembro de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Immunoinflammatory response in experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy: histomorphometric and immunohistochemical study**", Protocol FOA nº 2015-00590, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 05, 2015.

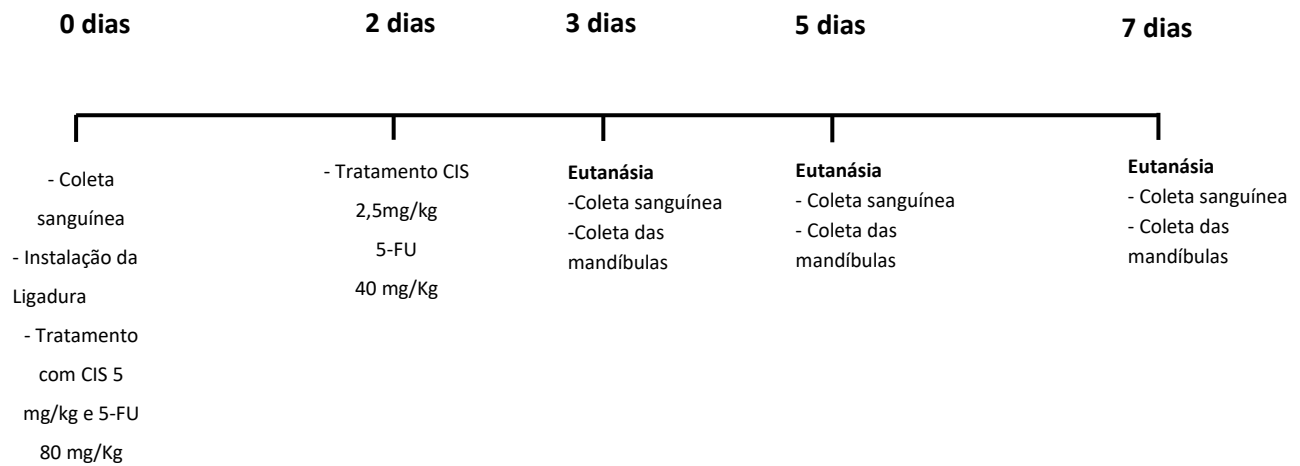
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 03, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 03, 2018.

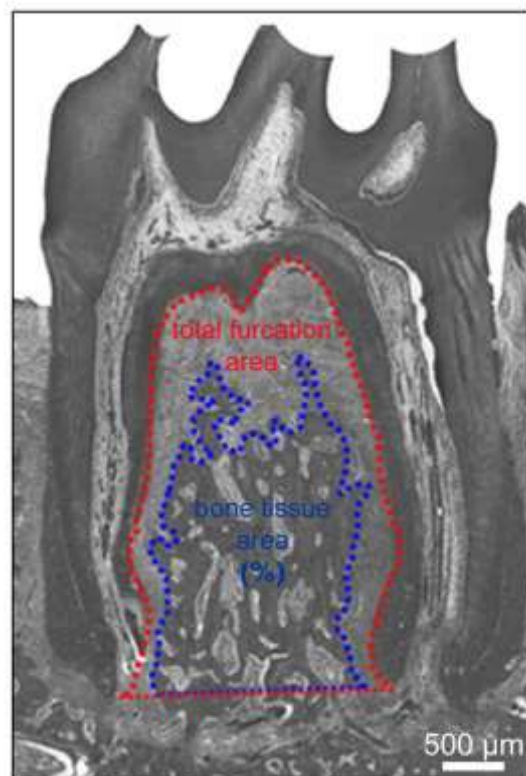

Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
 Coordenadora da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo B – Delineamento do Estudo



Anexo C – Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica.



Anexo D - Normas para Publicação segundo o Periódico - Journal of Periodontology.

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#)

Relevant Document: [Sample Manuscript](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Clinical Periodontology](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.



1. GENERAL

Journal of Clinical Periodontology publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Clinical Periodontology*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell's Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Clinical Periodontology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Journal of Clinical Periodontology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements. Please note that it is a requirement to include email addresses for all co-authors at submission. If any of the email-addresses supplied are incorrect the corresponding author will be contacted by the journal administrator.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

Journal of Clinical Periodontology encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be

accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Journal of Oral Rehabilitation requires that all authors (both the corresponding author and co-authors) disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, please contact the editorial office at cpeedoffice@wiley.com. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

[Conflict of Interest Disclosure Form](#)

2.6 Appeal of Decision

Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at cpeedoffice@wiley.com with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

Please note that all revisions and resubmissions of papers should also include a separate rebuttal and a tracked changes document to assist in peer review.

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available on the submission site. Further assistance can be obtained from the Senior Editorial Office Assistant, Kim Harris, at cpeedoffice@wiley.com.

Please note that all revisions and resubmissions of papers should also include a separate rebuttal and a tracked changes document to assist in peer review.

3.1. Manuscript Files Accepted

Main manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected). The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc. to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Figure files should be uploaded separately to the main text. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

Please ensure that ALL items (figures and tables) are cited in the main text.

3.2. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Clinical Periodontology* will be reviewed by two or more experts in the field. Papers that do not conform to the general aims and scope of the journal will, however, be returned immediately without review. *Journal of Clinical Periodontology* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.3. Suggest a Reviewer

Journal of Clinical Periodontology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the name and current email address of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the editor will choose one or two reviewers as well.

3.4. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.5. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.6 Resubmissions

If your manuscript was given the decision of reject and resubmit, you might choose to submit an amended version of your manuscript. This should be submitted as a new submission following the guidelines above under 3.2. In addition you should upload comments to the previous review as "supplementary files for review".

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Journal of Clinical Periodontology publishes **original research articles, reviews, clinical innovation reports** and **case reports**. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research.

Original Research Articles must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

Clinical Innovation Reports are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. Please refer to English Language Editing Services offered by Wiley at <http://wileyeditingservices.com/en/>.

Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.2. Structure

All articles submitted to Journal of Clinical Periodontology should include:

- Title Page
- Conflict of Interest and Source of Funding
- Clinical Relevance
- Abstract
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- References
- Tables (where appropriate)
- Figure Legends (where appropriate)
- Figures (where appropriate and uploaded as separate files)

All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

Title Page: The title must be concise and contain no more than 100 characters including spaces. The title page should include a running title of no more than 40 characters; 5-10 key words, complete names of institutions for each author, and the name, address, telephone number, fax number and e-mail address for the corresponding author.

Conflict of Interest and Source of Funding: Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Source of Funding Statement".

See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding](#) and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

Abstract: is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper.

For Original Research Articles the abstract should be organized with **aim, materials and methods, results and conclusions.**

For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

Clinical Relevance: This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of

how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice.

It should be structured with the following headings: **scientific rationale for study, principal findings, and practical implications.**

Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

5.3. Original Research Articles

These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

The word limit for original research articles is 3500 words, and up to 7 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

Main Text of **Original Research Articles** should be organized with

- Introduction,
- Materials and Methods,
- Results and Discussion.
- References (Harvard, see section 5.7)

The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

(a) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A **CONSORT checklist** should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

Journal of Clinical Periodontology encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial

to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(b) Statistical Analysis: As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

(c) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(d) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by [Richard Horton \(2002\), The Hidden Research Paper, The Journal of the American Medical Association, 287, 2775-2778](#)). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in mind.

Summary of key finding

- * Primary outcome measure(s)
- * Secondary outcome measure(s)
- * Results as they relate to a prior hypothesis

Strengths and Limitations of the Study

- * Study Question
- * Study Design
- * Data Collection
- * Analysis
- * Interpretation
- * Possible effects of bias on outcomes

Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

- * Is there a systematic review to refer to?
- * If not, could one be reasonably done here and now?
- * What this study adds to the available evidence
- * Effects on patient care and health policy
- * Possible mechanisms

Controversies Raised by This Study Future Research Directions

- * For this particular research collaboration
- * Underlying mechanisms
- * Clinical research

5.4. Clinical Innovation Reports

These are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

The word limit for clinical innovation reports is 3000 words, and up to 12 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

The main text of Clinical Innovation Reports should be organized with

- Introduction,
- Clinical Innovation Report,
- Discussion and Conclusion
- References (Harvard, see section 5.7)

5.5. Case Reports

Case reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

The main text of Case Reports should be organized with

- Introduction,
- Case report,
- Discussion and Conclusion
- References (see section 5.7)

5.6. Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

The word limit for reviews is 4000 words.

The main text of Reviews should be organized with

- Introduction,
- Review of Current Literature,
- Discussion and Conclusion
- References (Harvard, see section 5.7)

5.7. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

Reference style (Harvard):

References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966.

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

- a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.
- b) The order of the items in each reference should be:
 - (i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.
 - (ii) for book references: name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher.
- c) Authors' names should be arranged thus: Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Authors' names when repeated in the next reference are always spelled out in full.
- d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967).
- e) The title of the paper should be included without quotation marks.
- f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers.

Examples: Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* **10**, 820-828. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00565.x

Lindhe, J., Lang, N.P. & Karring, K. (2003) *Periodontology and Implant Dentistry*. 4th edition, p. 1014, Oxford. Blackwell Munksgaard.

Bodansky, O. (1960) Enzymes in tumour growth with special reference to serum enzymes in cancer. In *Enzymes in Health and Disease*, eds. Greenberg, D. & Harper, H. A., pp. 269-278. Springfield: Thomas.

URL: Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Example: Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November 2003]

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

5.8. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Each copy should be marked with the figure number and the corresponding author's name. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size. Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Guidelines for Cover Submission

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, [please follow these guidelines](#).

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

Figure Legends: should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

5.9. Supplementary Material

Supplementary material, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition, can be uploaded as 'Supporting information for review and online publication only'.

Please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp> for further information on the submission of Supplementary Materials.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

The Journal of Clinical Periodontology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Production Tracking

Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with **Wiley-Blackwell's Author Services**.

6.4 Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Given that copyright licensing

is a condition of publication, a completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format.

7. OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

8. Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions: http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant selfarchiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.