

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA
DEPARTAMENTO DE DIAGNÓSTICO DE CIRURGIA

Ruan Henrique Delmonica Barra

**Avaliação da influência do tratamento quimioterápico com
cisplatina e dose oncológica de zoledronato sobre a progressão da
periodontite experimental**

Araçatuba – SP

2022

Ruan Henrique Delmonica Barra

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – UNESP, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi
de Almeida.

Araçatuba – SP

2022

Este trabalho é dedicado à minha avó Tereza Barra, que mesmo na dificuldade da doença, contribuiu sempre com muito amor em minha caminhada. Sem você eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente através da fé em todos os obstáculos encontrados ao longo do curso.

A minha família que me incentivou nos momentos difíceis. Agradeço principalmente a minha mãe Karla Terezinha Barra por tornar essa conquista possível, a qual se mostrou uma das mulheres mais fortes que já conheci, sempre solicita quando precisei de seu carinho e cuidadosa com minha avó, que mesmo na cama, fez nossa caminhada possível. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu professor e orientador Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida pela confiança depositada em mim e também por todas as oportunidades ao longo da graduação. Sou grato pelas lições profissionais e pessoais dadas pelo senhor, minha sincera gratidão pela sua liderança, é um exemplo para mim.

Também agradeço aos outros professores que fizeram parte da minha caminhada. Em especial aos professores Profa. Dra. Ana Cláudia Okamoto e Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior, por terem sido os primeiros a me dar oportunidade dentro da faculdade e me despertarem a vontade da pesquisa. Ao Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani por todo companheirismo e amizade nos anos em que fiz parte do Cursinho D.A.C.A. A Dra. Nathália Januario por todo carinho e ajuda que me levou para disciplina de periodontia e a qual me espelho. E ao amigo e mestre Dr. Fábio Luis da Silva pelos ensinamentos clínicos além da faculdade, apoiados pelos anos de estágio, no qual muito aprendi.

Sou grato a toda equipe da disciplina de Periodontia, que me acolheu e tornou esse trabalho possível. Com vocês aprendi e fui incentivado na pesquisa, especialmente a Elisa, ao Henrique, a Bianca e ao Guilherme Fiorin por sempre me ajudarem em todas as etapas deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos de infância Domênica, Lara, Marco Antônio e Sarah por se tornarem parte da minha família, me apoiar em minhas decisões e não deixarem a amizade acabar em todos esses anos, mesmo com a distância.

Por fim, agradeço aos amigos que ganhei em minha jornada como um presente da graduação. Obrigado Artur, Gisele, Larissa, Izabela, Ana Lívia, Victor Hugo, Bruna, Letícia Antunes, Amanda, Guilherme, Bianca Bialon, Jéssica, Isadora e Letícia Ikejiri por sempre estarem do meu lado. Com vocês a jornada foi mais fácil e mais leve.

“Quem quiser nascer tem que destruir um mundo; destruir no sentido de romper com o passado e as tradições já mortas, de desvincular-se do meio excessivamente cômodo e seguro da infância para a conseqüente dolorosa busca da própria razão do existir: ser é ousar ser.”

Herman Hesse (Demian)

Ruan Henrique Delmonica Barra, **Avaliação da influência do tratamento quimioterápico com cisplatina e dose oncológica de zoledronato sobre a progressão da periodontite experimental**. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Os antineoplásicos têm sido estudados como medicamentos que podem influenciar a progressão da periodontite. Dentre eles, a Cisplatina (CIS), um composto com ampla atividade antineoplásica, sendo utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres como, por exemplo, o câncer de cabeça e pescoço. Durante o tratamento com os quimioterápicos, é visto a associação com o bisfosfonato, ácido zolendrônico (ZOL) por representar uma opção terapêutica para complicações esqueléticas, alívio de dor e prevenção de metástases ósseas em neoplasias malignas osteotrópicas. Dentre as complicações ocasionadas pelo uso dos bifosfonatos (BPs) destaca-se na cavidade bucal a osteonecrose dos maxilares (ONM-m), principalmente oriunda de procedimentos cirúrgicos bucais, como extrações de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da quimioterapia com cisplatina (CIS) combinada com uso de zoledronato (ZOL) na progressão da periodontite experimental (PE) em ratos. Oitenta ratos foram divididos em 4 grupos experimentais: **Grupo SS/SS (n=20)**: duas injeções de 0,5 ml de solução salina a 0.9%; **Grupo CIS/SS (n=20)**: uma injeção de Cisplatina (5mg/kg) e outra injeção de 0,5 ml de solução salina a 0.9%; **Grupo SS/ZOL (n=20)**: uma injeção 0,5 ml de solução salina a 0.9% e uma injeção de 100 µg/kg de zoledronato diluído 0,45 ml em solução de cloreto de sódio 0,9%; **Grupo CIS/ZOL (n=20)**: uma injeção de Cisplatina (5mg/kg) e uma injeção de 100 µg/Kg de zoledronato diluído 0,45 ml em solução de cloreto de sódio 0,9%. Todas as aplicações foram via intraperitoneal e realizadas no intervalo de três dias, por oito semanas. Decorridas quatro semanas de tratamento medicamentoso, a indução da periodontite experimental (PE) foi realizada em todos os animais, através da instalação de fio de algodão nº 24 ao redor dos primeiros molares inferiores. Após 14 e 28 dias da PE, os animais foram submetidos à eutanásia e as mandíbulas foram processadas para análise histológica na região de furca, análise histométrica de porcentagem de osso na furca (POF) e porcentagem de osso necrosado (PON). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). Os Grupos CIS/SS, SS/ZOL e CIS/ZOL apresentaram severa desestruturação dos tecidos conjuntivo e ósseo na região de furca, além de apresentarem uma maior extensão do processo inflamatório quando comparados com PE-SS/SS, que se estendia por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca aos 14 e 28 dias. Maior POF e PON foram observadas nos grupos SS/ZOL e CIS/ZOL comparado a SS/SS e CIS/SS aos 14 e 28 dias. Dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que os efeitos do uso combinado de CIS e ZOL potencializam a progressão da periodontite, além de ocasionarem a ocorrência de eventos osteonecróticos, aumentando o risco de ONM-m.

Palavras-chave: Periodontite Experimental; Zoledronato; Cisplatina; Quimioterapia.

Ruan Henrique Delmonica Barra, **Evaluation of the influence of the treatment with the antineoplastic agent cisplatin and oncologic dosages of zoledronate on the progression of experimental periodontitis.** 2022. Trabalho de conclusão de curso – São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba. 2022.

ABSTRACT

Antineoplastic agents have been studied as potential drugs influencing the progression of periodontitis. Among them, Cisplatin (CIS), a drug with great antineoplastic activity, is used for the treatment of multiple types of cancer, such as head and neck. During the antineoplastic regimen, combination therapy with the bisphosphonate zoledronic acid (ZOL) is applied due to the therapeutic efficacy in reducing skeletal complications, pain relief, and prevention of bone metastasis in osteotropic malignancies. Among the oral complications caused by BPs, we can highlight the occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ), mainly following surgical procedures in teeth periodontally and endodontically compromised. Hence, the present study aimed to evaluate the effects of a chemotherapeutic regimen combining CIS and ZOL on the progression of experimental periodontitis (EP) in rats. Eighty rats were divided into 4 experimental groups: **Group SS/SS(n=20)**: two injections of 0.5 ml of 0.9% saline solution (SS); **group CIS/SS(n=20)**: one injection of CIS (5 mg/kg) and another of 0.5 ml of SS; **group SS/ZOL(n=20)**: one injection of 0.5 ml of SS and another of 100 µg/kg of ZOL dissolved in 0.45 mL of SS; group **CIS/ZOL(n=20)**: one injection of CIS (5 mg/kg) and another of 100 µg/kg of ZOL dissolved in 0.45 mL of SS. All injections were administered via intraperitoneal within a 3-day interval, for 8 weeks. Following four weeks from the beginning of the drug regimen, EP was induced in all animals by means of a cotton thread (#24) placed around the mandibular first molars. After 14 and 28 days of induction, animals were euthanized and the mandibles collected and prepared for histologic analysis of the furcation, histometric analysis of the percentage of bone in the furcation (PBF), and percentage of necrotic bone (PNB). Data were statistically analyzed ($p \leq 0,05$). Groups CIS/SS, SS/ZOL, and CIS/ZOL presented with a severe breakdown of the connective tissue proper and bone tissue of the furcation, and greater extension of the inflammatory process (extending through the whole connective and bone tissue in the furcation), as compared with SS/SS at 14 and 28 days. Higher PBF and PNB were observed in SS/ZOL and CIS/ZOL compared with SS/SS and CIS/SS at 14 and 28 days. Within the limitations of the present study, it can be concluded that combination therapy with CIS and ZOL aggravates the progression of EP and leads to osteonecrotic events in the furcation, increasing the risk of developing MRONJ.

Key-words: Experimental Periodontitis; Zoledronate; Cisplatin; Chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento da pesquisa	20
Figura 2	Análise clínica aos 14 dias	24
Figura 3	Análise clínica aos 28 dias	25
Figura 4	Fotomicrografias da região de furca	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo em ratos com periodontite experimental induzida nos diferentes grupos e períodos experimentais.	27
Tabela 2	Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) da porcentagem de osso na furca (POF) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.	30
Tabela 3	Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) da porcentagem de osso necrosado (PON) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

DP	Doença periodontal
CIS	Cisplatina
PE	Periodontite experimental
ZOL	Zoledronato
BP	Bisfosfonato
ONM-m	Osteonecrose dos maxilares relacionada com medicamentos
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
H&E	Hematoxilina/ Eosina
POF	Porcentagem de tecido ósseo na região de furca
AF	Área total de furca
AO	Área de tecido ósseo
PON	Porcentagem de tecido ósseo necrosado na furca
ON	Osso necrosado

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Material e métodos	16
3. Resultados	24
4. Discussão	32
5. Conclusão	38
Referências Bibliográficas	39
Anexos	46

1. Introdução

Os tecidos periodontais saudáveis estão susceptíveis aos efeitos de uma grande variedade de drogas, sobretudo, aquelas que agem sobre o sistema imune e a resposta inflamatória. Esses efeitos são ainda mais pronunciados no cenário das doenças periodontais (DPs), como gengivites e periodontites (Alani & Seymour, 2014). A bibliografia mostra que medicamentos como antidepressivos, benzodiazepínicos, imunossupressores, anticonvulsivantes, contraceptivos orais e anti-hipertensivos podem causar modificações sistêmicas capazes de influenciar e modificar a progressão da DP (Aguiar et al., 2013; Araújo et al., 2013; Gomes et al., 2013; Kim et al., 2013; Nakib & Ashrafi, 2011; Nassar et al., 2009; Preshaw, 2013; Seymour, 2006; Spolidorio et al., 2007). Além do mais, os agentes antineoplásicos apresentam impacto significativo no sistema imune e frequentemente são apontados na literatura como medicamentos que podem influenciar a progressão da DP (Garcia et al., 2015; Gusman, 2017; Theodoro et al., 2016).

Os quimioterápicos produzem efeitos tóxicos na cavidade bucal devido à característica de rápida divisão celular dessa região. As drogas usadas apresentam limitada especificidade sobre as células cancerosas, tornando-se lesivas a todas as células por não diferenciar células normais com alto índice mitótico de células neoplásicas (Arias, 2008; Guchelaar et al., 1998; Guggenheimer et al., 1977; McGuire, 2002).

A grande maioria dos tratamentos quimioterápicos de neoplasias baseia-se na administração de uma dose máxima tolerável pelo paciente, para possibilitar a eliminação ou impedir e dificultar o crescimento das células cancerígenas. Entretanto, a metodologia quimioterápica convencional apresenta uma grande

quantidade de efeitos colaterais, oriundos da toxicidade aguda acumulada nos tecidos não cancerosos, incluindo as células do sistema imunológico, causando um quadro severo de imunossupressão (Half & Arber, 2009; Saltz & Kemeny, 1996).

A Cisplatina (CIS) tem se apresentado como um dos principais compostos quimioterápicos de escolha dentre os diversos fármacos antineoplásicos (Lorch et al., 2011; Surendiran et al., 2010; Taylor et al., 1994; Vermorken et al., 2014). É amplamente utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, como: os de cabeça e pescoço, testículo, pulmão, mama, urotelial, ovário, glândula adrenal, carcinoma de bexiga e melanoma avançado, cujas incidências aumentam com o passar dos anos, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (Choi et al., 2015; Linardou et al., 2015; Mihai, 2015; Pang et al., 2007; 25 Wang & Lippard, 2005; Zhang et al., 2009).

Em relação a ação dos quimioterápicos nos tecidos periodontais, é possível encontrar estudos, como os de Garcia et al. (2015) e Theodoro et al. (2016), que elucidam um agravamento da periodontite experimental (PE) induzida em ratos em períodos longos de 14, 22 e 37 dias após indução. Além disso, a aplicação dos quimioterápicos exacerbou a resposta inflamatória nos tecidos periodontais de ratos sem indução da PE, e nas cobaias em que a PE foi induzida, observou-se rápida e intensa destruição óssea nos períodos iniciais de 3, 5 e 7 dias após a indução (Gusman, 2017).

Durante o tratamento com os quimioterápicos, é visto na literatura, a associação com o bisfosfonato (BP) ácido zoledrônico (ZOL), pois este medicamento emergiu como uma opção terapêutica para complicações esqueléticas, alívio de dor e prevenção de metástases ósseas em neoplasias malignas osteotrópicas (mama,

rim, pulmão e próstata) (Coleman, 2005; Hortobagyi, 2005; Drake et al., 2008; Zhao et al., 2011; Winter et al., 2013). Ele também é usado para osteopatias como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo, hipercalcemia (Drake et al., 2008).

Dentre as reações adversas ocasionadas pelo uso dos BPs, destaca-se na área da odontologia, a osteonecrose dos maxilares relacionada com medicamento (ONM-m) (Russell, 2011). A ONM-m é definida como presença de osso exposto na região maxilofacial por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos à tratamento prévio ou atual com droga anti-reabsortiva ou anti-angiogênica, e que não possui história prévia de radioterapia nos maxilares (Ruggiero et al., 2014). A ONM-m (BPs) é uma doença multifatorial e os principais fatores desencadeadores atualmente são: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, o que resulta no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo e consequentemente áreas de tecido ósseo não vital, o que seria capaz de favorecer o estabelecimento de necrose; o potente efeito anti-angiogênico dos BPs, o que resultaria em necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzido pelos BPs, os quais aumentam sobremaneira a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto; e o efeito citotóxico dos BPs sobre as células dos tecidos que compõem a mucosa bucal, o que resulta na diminuição da capacidade de reparo dos tecidos moles (Allen & Burr, 2009; Ruggiero et al., 2014).

Aguirre et al. (2012) realizaram um estudo onde avaliaram a progressão da periodontite experimental durante tratamento crônico com dose oncológica de zoledronato. Todavia tais autores utilizaram de uma linhagem bastante susceptível de ratos e o modelo de indução da doença foi baseado em uma dieta específica, ou seja, deixando de mimetizar a condição que ocorre em humanos. Aghaloo et al.

(2013) e Li et al. (2014) empregaram o modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos tratados com zoledronato, no entanto, tais autores restringiram significativamente a duração do protocolo medicamentoso, condição esta que não ocorre no tratamento em humanos. Em todos os trabalhos citados verificou-se que a terapia com zoledronato exacerba a resposta inflamatória e o dano tecidual em alguns casos induziu o desencadeamento da osteonecrose.

Embora consideremos que algumas condições relacionadas com o modelo experimental, ou com o tratamento medicamentoso possam ser ainda mais adequadas para mimetizar com maior precisão o que ocorre em humanos, são fortes os indícios de uma correlação entre DP e ONM-m durante tratamento com zoledronato. Desta forma, existe grande preocupação em se conhecer detalhadamente os efeitos nos tecidos periodontais que podem ser induzidos pela associação de CIS e ZOL, levando em consideração o efeito deletério causados nas células dessa região, visando melhor conhecimento de suas ações sobre a evolução da periodontite experimental em ratos. Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da quimioterapia com CIS combinada ao uso de ZOL sobre os tecidos periodontais na progressão da periodontite experimental induzida em ratos.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

No presente estudo foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 260g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Araçatuba e posteriormente mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA/UNESP, sob as condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola), onde tiveram ração (Ração Guabi Nutrilabor – Mogiana Alimentos S.A) e água *ad libitum*. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, e evitar o seu sofrimento. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com 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.) após aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da FOA/UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2.2 Cálculo amostral e grupos experimentais

Para determinação do tamanho amostral, dois pontos foram considerados: 1 – Estudos prévios com metodologia semelhante (de Almeida et al., 2007; de Almeida

et al., 2008a,b; Fernandes et al.,2009) Foi realizado um estudo piloto e determinada a diferença mínima entre as médias obtidas de cada tratamento. Determinado o poder do teste de 80% com valor de α de 5%. Estes dados foram submetidos ao BioEstat 5.0 (BioEstat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil), que determinou um número mínimo de 8 repetições por tratamento em cada período. Considerando a possibilidade de perdas em animais modificados sistemicamente, o número de animais em cada período experimental foi estabelecido em 10 animais.

Desta forma, foram utilizados 80 ratos distribuídos seguindo uma tabela gerada por um programa computacional (Minitab® 17 - Minitab Inc. StateCollege, PA, USA), com periodontite experimental (PE) induzida que receberam os seguintes tratamentos sistêmicos:

Grupo PE-SS/SS (n=20): Com periodontite experimental induzida. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções de 0,5 ml de solução salina a 0.9% a cada intervalo de três dias, durante oito semanas.

Grupo PE-CIS/SS (n=20): Com periodontite experimental induzida. Os animais pertencentes a este grupo receberam uma injeção de Cisplatina (5mg/kg) e outra injeção 0,5 ml de solução salina a 0.9% a cada intervalo de três dias, durante oito semanas.

Grupo PE-SS/ZOL (n=20): Com periodontite experimental induzida. Os animais pertencentes a este grupo receberam uma injeção 0,5 ml de solução salina a 0.9% e

uma injeção de 100 µg/kg de zoledronato diluído 0,45 ml em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de três dias, durante oito semanas.

Grupo PE-CIS/ZOL (n=20): Com periodontite experimental induzida. Os animais pertencentes a este grupo receberão uma injeção de Cisplatina (5mg/kg) e uma injeção de 100 µg/kg de zoledronato diluído 0,45 ml em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de três dias, durante oito semanas.

2.3 Sedação e Anestesia

Inicialmente os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrado. Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70 mg/Kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA.) e 6 mg/kg de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil), aplicados intramuscular no bíceps femoris da pata direita. Nos casos em que não se obteve o necessário efeito do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada (Fernandes et al., 2009).

2.4 Método de Indução da Periodontite Experimental

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada a qual permitiu a manutenção da abertura bucal facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº 24; Coats Corrente, SP, Brasil.) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, ao nível do sulco

gengival e mantido por meio de nós cirúrgicos. Esta ligadura atuou como irritante gengival favorecendo o acúmulo de biofilme bacteriano (Johnson, 1975).

2.5 Protocolo medicamentoso

A administração de Solução Salina a 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), Cisplatina (Fauldcispla, 10 mg/10 ml, Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) ou zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal. Para a Cisplatina a dose foi de 5 mg/kg (Havelka et al., 2007). A dose de zoledronato foi de 100µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. A dose de cisplatina, zoledronato e o plano de tratamento medicamentoso consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para terapia oncológica de humanos (Du Bois & Du Bois, 1989; Zhao et al., 2011; Nakasato et al., 2012; Winter et al., 2013; FoodandDrugAdministration, 2016).

2.6 Delineamento da Pesquisa



Figura 1: Esquema mostrando os procedimentos experimentais em seus respectivos intervalos de tempo nos grupos tratados com SS, CIS, ZOL e suas associações.

2.7 Períodos de Análise

Dez animais de cada grupo experimental foram submetidos à eutanásia aos 14 e 28 dias após indução da PE. O procedimento de eutanásia foi realizado por meio de dose letal de anestésico (Thiopental 150 mg/kg - Thiopentax; Cristalia, São Paulo, Brazil). Logo após a morte, a mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes, e acondicionadas em frascos contendo solução de formaldeído a 4% por um período mínimo de 48 horas.

2.8– Análises Propostas

2.8.1 - Análise Clínica

Nos períodos da eutanásia os animais foram colocados em mesa operatória apropriada para facilitar a abertura bucal com um mini afastador Farabeuf para lábio inferior esquerdo (D70 – Nikon Corporation, Japão). Com uma máquina fotográfica digital foram capturadas fotos padronizadas para análises clínicas das áreas vestibulares, linguais, mesiais e distais verificando-se a presença ou ausência de osso necrótico exposto com ou sem sinais de infecção, fraturas dentais ou ósseas patológicas, fístula oro-cutânea e/ou extensão da necrose para a borda inferior do ramo da mandíbula.

2.8.2 Processamento para Análise Histológica

Após fixação em paraformaldeído 4% por um período mínimo de 48 horas das peças, estas foram lavadas em água corrente por 12 horas e, colocadas para descalcificação em solução de EDTA à 10% por um período médio de 8 semanas, com trocas semanais. Estando as peças suficientemente descalcificadas, foram aparadas, lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Durante a inclusão, as peças foram posicionadas com a face vestibular paralela ao plano de corte. Os cortes foram realizados no sentido mésio-distal, com o cuidado de sempre estarem no longo eixo do dente envolvendo as raízes mesial e distal. Os cortes seriados com 4 µm de espessura foram corados pela técnica da hematoxilina/eosina (H&E). Após exclusão do primeiro e último corte onde a área de furca estava evidente, as lâminas foram selecionadas para a descrição histológica (de Almeida et al., 2008b).

2.8.3 Análise Histopatológica

A análise histopatológica foi efetuada por um histologista certificado, cego ao experimento o qual avaliou os seguintes parâmetros: grau de inflamação, presença e extensão de necrose tecidual, presença e extensão de sequestro ósseo, estado da vasculatura, padrão de celularidade e de estruturação da matriz extracelular dos tecidos conjuntivo, ósseo e hematopoiético em toda a região de furca dos primeiros molares inferiores. Para cada parâmetro foi atribuído escore de 0 a 3.

2.8.4 Análise Histométrica

Os cortes corados pela técnica de H&E foram capturados com aumento de 4x utilizando um sistema de captura de imagem acoplado no microscópio óptico de luz. Para a determinação da Porcentagem de Tecido Ósseo na Região de Furca (POF) dos primeiros molares inferiores esquerdos foi utilizando um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl ZeissMicroImagingGmbH, 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 calculado 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 a 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 ($POF = (AO \times 100) / AF$). A POF de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador, calibrado e cego aos grupos experimentais em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados (Garcia et al., 2014).

Para a determinação da Porcentagem de Tecido Ósseo Necrosado na Região de Furca (PON) dos primeiros molares foi utilizado o sistema de análise descrito acima. Na AF contornou-se a(s) área(s) constituída por tecido ósseo necrosado (ON). PON foi calculada multiplicando-se ON por 100 e dividindo-se por AF ($PON = (ON \times 100) / AF$). A POF e a PON foram expressas em mm² e como média + desvio padrão em cada grupo experimental.

2.9 Calibração do Examinador

Antes da análise histométrica ser iniciada, o examinador foi treinado medindo duas vezes a perda óssea ao redor do primeiro molar inferior direito, POF e a PON.

2.10 Análise Estatística dos Resultados

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram testadas e os mesmos submetidos ao teste paramétrico ou não paramétrico mais adequado. Para todos os testes, o nível de 5% de significância será adotado.

3 Resultados

O poder do estudo foi calculado com os 80 animais e demonstrou-se com 95% de confiabilidade e KAPPA.

3.1 Análise clínica

Na análise clínica não foi observado presença de osso necrótico exposto com ou sem sinais de infecção, fraturas dentais ou ósseas patológicas, fístula oro - cutânea e/ou extensão da necrose para a borda inferior do ramo da mandíbula. Foi observado somente grande quantidade de placa bacteriana aos 28 dias após a indução da PE nos grupos PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL comparado aos demais grupos (Fig. 2 - A, B, C, D).

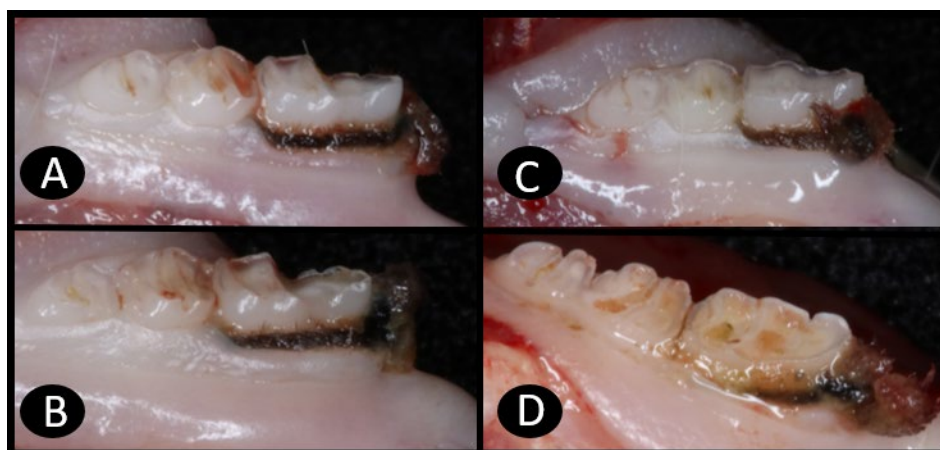


Fig. 2: Análise clínica no momento da eutanásia aos 14 dias após indução de PE. Nota-se acúmulo de placa bacteriana nos grupos PE-SS/SS (A) e PE-CIS/SS (B). Nota-se acúmulo de placa bacteriana pela indução da PE sem nenhuma característica da ONM nos grupos PE-SS/ZOL (C) e PE-CIS/ZOL (D).

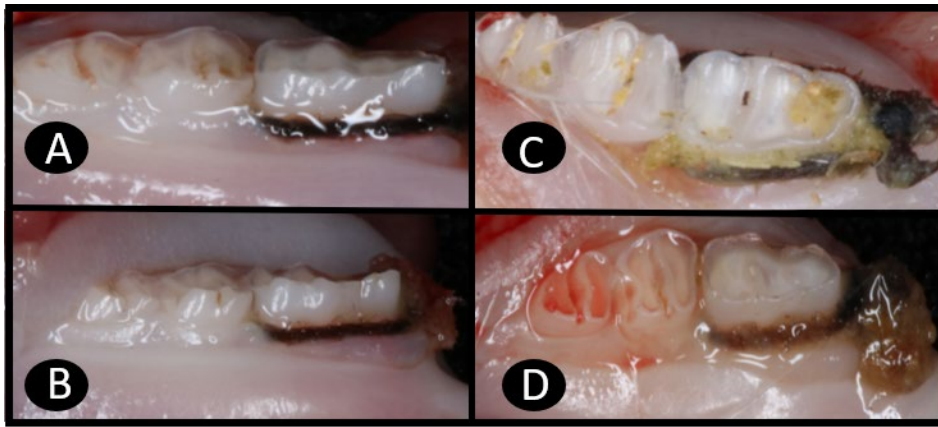


Fig. 3: Análise clínica no momento da eutanásia aos 28 dias após indução da PE. Nota-se acúmulo de placa bacteriana nos grupos PE-SS/SS (A) e PE-CIS/SS (B). Nota-se grande quantidade de placa bacteriana pela indução da PE sem nenhuma característica da ONM nos grupos PE-SS/ZOL (C) e PE-CIS/ZOL (D).

3.2 Análise histológica

O grupo PE-SS/SS (Tabela 1) apresentou inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias) aos 14 dias e inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias) aos 28 dias (Figura 3 - A, E, I e M). PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior intensidade da resposta inflamatória local quando comparados com PE-SS/SS ($p \leq 0,05$), apresentando inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias) aos 28 dias (Figura 3 - A-P).

Com relação à extensão do processo inflamatório, PE-SS/SS apresentou um processo inflamatório que se estendia por todo o tecido conjuntivo da região de furca aos 14 e 28 dias (Figura 4 - A, E, I e M). PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior extensão do processo inflamatório quando comparados com PE-SS/SS ($p \leq 0,05$), que se estendia por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca aos 14 e 28 dias (Figura 4 - A-P).

Com relação ao padrão de estruturação do tecido conjuntivo e ósseo da região de furca, PE-SS/SS apresentou pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de

fibras colágenas, com trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos aos 14 e 28 dias (Figura 3 - A, E, I e M). PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior desestruturação do tecido conjuntivo e ósseo da região de furca quando comparados com PE-SS/SS ($p \leq 0,05$), prevalecendo desestruturação tecidual severa com áreas de necrose no tecido conjuntivo e áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos (Figura 3 - A-P).

Tabela 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo em ratos com periodontite experimental induzida nos diferentes grupos e períodos experimentais.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA								
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES GRUPOS EXPERIMENTAIS							
	PE-SS/SS		PE-SS/ZOL		PE-CIS/SS		PE-CIS/ZOL	
	14d	28d	14d	28d	14d	28d	14d	28d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATORIA LOCAL								
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-	-	-	-	-
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias)	40%	60%	-	-	-	-	-	-
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias)	60%	40%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Mediana	4	3	4	4 [†]	4	4 [†]	4	4 [†]
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO								
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	40%	60%	-	-	-	-	-	-
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	60%	40%	-	40%	-	20%	-	-
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	-	-	100%	60%	100%	80%	100%	100%
Mediana	3	2	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA								
1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	-	-	-	-	-	-	-	-
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	-	-	-	-	-
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	100%	100%	40%	-	40%	-	-	-
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	-	-	60%	100%	60%	100%	100%	100%
Mediana	3	3	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA								
1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	-	-	-	-	-	-	-	-
2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	-	-	-	-	-	-
3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	100%	100%	20%	-	40%	-	-	-
4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	-	-	80%	100%	60%	100%	100%	100%
Mediana	3	3	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]

Análise inter-grupo: *Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS aos 28 dias.

†Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS aos 14 e 28 dias. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$) em todos os testes.

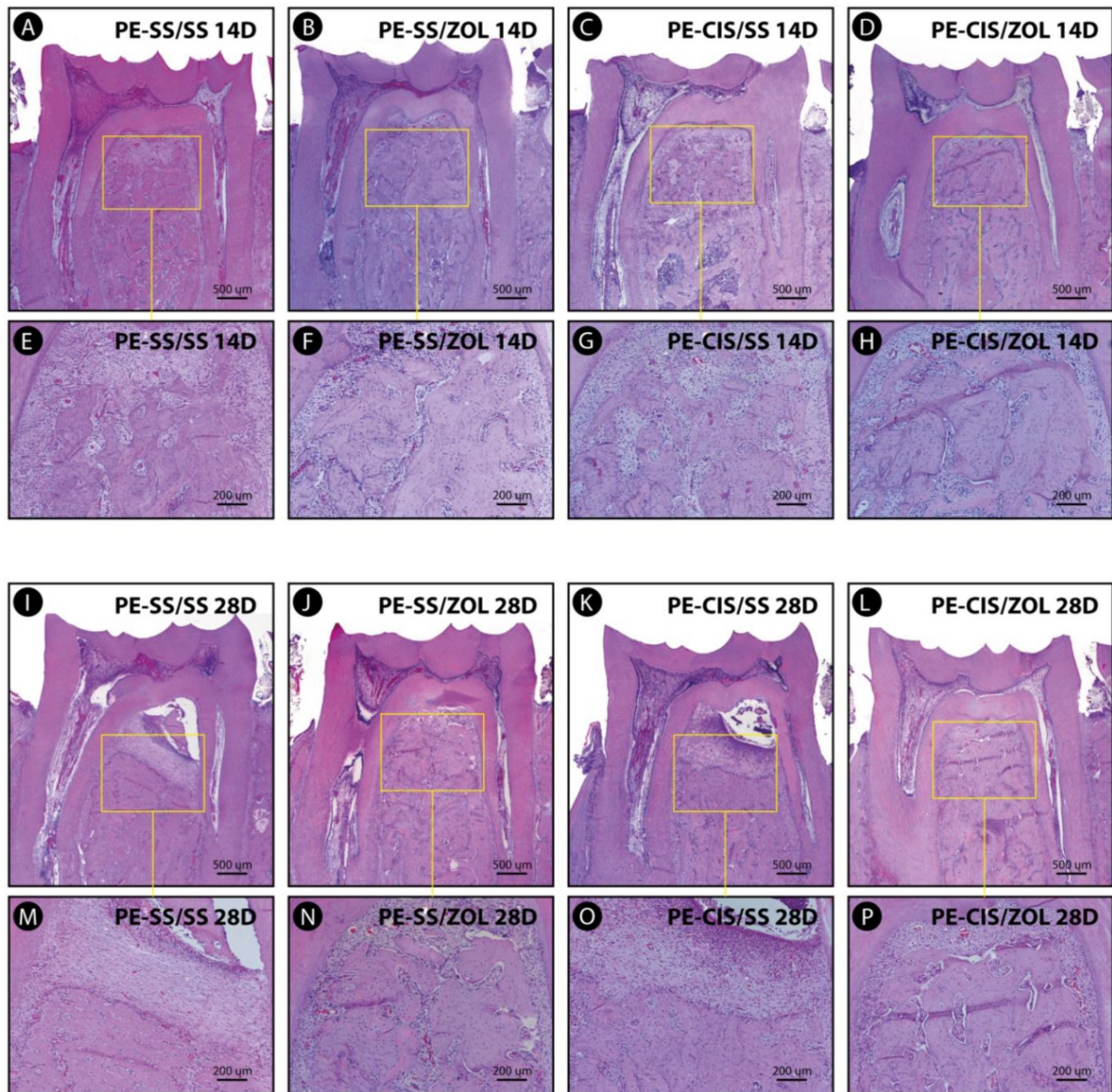


Figura 4: Fotomicrografias evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de ratos com periodontite experimental nos períodos de 14 e 28 dias (A-P). Pequena perda óssea em PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL (B, F, J, N, D, H, L e P). PE-SS/SS < PE-CIS/SS < PE-SS/ZOL < PE-CIS/ZOL em relação à quantidade de PON (osteócitos). Abreviações: CIS: Cisplatina; D: dias; µm: micrometros; SPE: sem periodontite experimental; SS: solução salina; ZOL: zoledronato. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 µm.

3.3 Análise histométrica de POF e PON

O teste Kappa indicou 94% de concordância nas medidas de POF e de PON intraexaminador.

Os resultados de POF estão representados na tabela 2 e Figura 4 (A-D e I-L) (PE). Foi observado que PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL apresentaram maior POF quando comparados com PE-SS/SS e PE-CIS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). PE-CIS/SS apresentou menor POF quando comparado a PE-SS/SS aos 28 dias ($p \leq 0,05$).

Os resultados de PON estão representados na tabela 3, Figura 4 (E-H e M-P). Nos animais com PE, PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior PON quando comparados a PE-SS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL apresentaram maior PON quando comparado com PE-CIS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). Além disso, PE-CIS/ZOL apresentou maior PON comparado com PE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$).

Tabela 2: Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) da porcentagem de osso na furca (POF) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.

Grupos		
Grupos	14 Dias	28 Dias
PE-SS/SS	68.07 $\pm$ 8.34	60.61 $\pm$ 5.62
PE-SS/ZOL	79.06 $\pm$ 3.1*	78.30 $\pm$ 1.80*
PE-CIS/SS	65.48 $\pm$ 4.84	50.92 $\pm$ 4.12†
PE-CIS/ZOL	78.77 $\pm$ 1.85*	81.04 $\pm$ 7.09*

Comparação inter-grupo: * Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS e PE-CIS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$). † Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3: Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) da porcentagem de osso necrosado (PON) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.

Grupos		
Grupos	14 Dias	28 Dias
PE-SS/SS	2.00 ± 0.47	2.38 ± 0.40
PE-SS/ZOL	$15.68 \pm 2.20^{*\dagger}$	$29.58 \pm 3.26^{*\dagger}$
PE-CIS/SS	$9.24 \pm 1.41^*$	$13.44 \pm 1.12^*$
PE-CIS/ZOL	$40.36 \pm 5.19^{*\dagger\ddagger}$	$45.40 \pm 7.51^{*\dagger\ddagger}$

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

4 Discussão

O delineamento de pesquisas laboratoriais que tenham um resultado clínico significativo dentro da odontologia é, hoje em dia, um desafio, pois interações celulares complexas são tipicamente ignoradas, o que leva a comparação destes com estudos em humanos em que mecanismos são difíceis de serem provados. Entretanto, na periodontia, a utilização de modelos experimentais animais bem padronizados e capazes de mimetizar com certa precisão o cenário clínico, tem contribuído significativamente não somente para o esclarecimento de formas de prevenção, compreensão da patogênese e proposição de tratamentos da PE (Almeida et al., 2007; Almeida et al., 2008a, 2008b; Bezerra et al., 2002; Graves, 2008; Graves & Cochran, 2003; Kesavalu et al., 2007; Molon, Avila & Cirelli, 2013; Molon et al., 2014; Polak et al., 2009), mas também para a elucidação da influência de modificações sistêmicas em tecidos periodontais saudáveis, não acometidos pela PE (Gusman et al., 2019; Nieh et al., 1996). O uso de modelos animais é o primeiro passo para a validação da pesquisa in vitro, um modelo confiável é essencial para correlacionar a causa ao efeito. Conhecendo suas limitações, em ratos o padrão de perda óssea parece mimetizar o padrão humano uma característica importante que nos permite uma investigação mais aprofundada de medicamentos que possuem ação sobre esses tecidos (Hollinger et al., 1990). Este estudo foi conduzido em sobre os princípios da “reduction”, “refinement” e “replacement” para o uso dos animais em laboratório.

Estudos que trabalharam isoladamente os efeitos da CIS ou do ZOL no periodonto evidenciaram ações deletérias de tais medicamentos sobre estes tecidos (Araujo, 2017; Gusman et al., 2019). Já, na perspectiva clínica, existem estudos como o de Okamoto et al. e o Winter et al., ambos de 2013, que relatam o uso da combinação

de CIS e ZOL para tratamento de neoplasias osteotrópicas, entretanto sem evidenciar o impacto desse tratamento sobre tecidos periodontais saudáveis ou acometidos pelas DPs. Neste cenário, nota-se que apesar do alto sucesso da associação destes medicamentos no tratamento de câncer relatado na literatura, cuidados paliativos com objetivo de reduzir estresse adicional ao paciente tornam-se necessários, principalmente quando pensamos na ONM-M, o efeito colateral de maior relevância dos BPs para o cirurgião dentista, tendo clara a ideia de que estes fármacos podem permanecer incorporados no tecido ósseo por até 10 anos (Di Fede et al. 2018). Logo, conhecer os efeitos da combinação de CIS e ZOL é a uma ferramenta para minimizar a ocorrência de reações adversas e assegurar o bem-estar para os pacientes, independentemente dos resultados do tratamento do câncer.

Os grupos PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram significativo aumento na intensidade da resposta inflamatória quando comparados com PE-SS/SS aos 28 dias. Ainda é possível observar que PE-SS/SS e PE-CIS/SS apresentaram maior desestruturação do tecido conjuntivo da região de furca, quando comparados aos grupos que receberam o zoledronato aos 14 e 28 dias. A presença do aumento de inflamação nestes grupos pode ser explicada pela própria agressão proveniente da infecção experimental causada para induzir a periodontite, somada aos danos provenientes da ação do agente quimioterápico no grupo PE-CIS/SS. A literatura mostra que a depuração bacteriana é reduzida quando o fluxo salivar diminui, resultando no acúmulo de biofilme contendo patógenos periodontais (Ciancio, 2005; Mizutani et al., 2015). Portanto, é plausível inferir que esses mecanismos comprovam os achados deste trabalho, uma vez que a presença da periodontite induz a inflamação, como observado nos animais do grupo SS/SS.

A exacerbação do processo inflamatório mediante a influência dos quimioterápicos durante a progressão da PE em animais está em evidência na literatura (Garcia et al., 2014, 2015; Gusman et al., 2019). Estes estudos relatam o aumento da intensidade e extensão do processo inflamatório e maior desestruturação dos tecidos conjuntivo e ósseo na região de furca em ratos que receberam a administração de quimioterápicos. Além disso, os mesmos achados consolidam, em parte, com os estudos clínicos de Mazzeo et al. (2009), os quais observaram aumento do sangramento a sondagem durante a terapia com um quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), que foi revertido no final do tratamento. Diante do exposto, Gusman et al. (2019) relataram que a perda óssea nestes animais progride de maneira mais rápida, o que corrobora com os resultados deste estudo, uma vez que PE-CIS/SS apresentou menor POF quando comparado a PE-SS/SS aos 28 dias, explicado pela citotoxicidade da droga e um ambiente complexo com microorganismos e inflamação que podem provocar maior atividade osteoclástica.

Os mecanismos de ação exatos da CIS ainda não estão totalmente elucidados na literatura. A CIS aparenta inibir os processos celulares fundamentais levando a danos no DNA (Dasari & Tchounwou, 2014; Longley, Harkin, & Johnston, 2003). Além das células neoplásicas serem alvo, outros tecidos caracterizados pelo alto índice mitótico, como medula óssea, tecidos periodontais e mucosa gastrointestinal são afetadas significativamente. Outro tecido que tem uma alta taxa de divisão celular é o epitélio juncional, o qual tem papel central na defesa dos tecidos periodontais contra a virulência microbiana, sendo que a integridade desse epitélio é essencial para a homeostase periodontal (Groeger & Meyle, 2015; Schroeder & Listgarten, 1997; Groeger & Meyle, 2015; Tsukamoto et al., 2012). Desta forma, os agentes antineoplásicos afetam a divisão celular em sua camada basal, resultando

em um epitélio mais fino, mais susceptível a ulcerações. Sobre este tema, Gusman et al. (2019) observaram que a utilização de alguns quimioterápicos provocam uma destruição no epitélio juncional em ratos sem periodontites.

Em relação aos grupos que receberam o zoledronato, houve uma singela diminuição do espaço do ligamento periodontal observada pela POF aos 28 dias, devido ao ZOL potencializar discretamente a atividade dos osteoblastos (Carbonare et al., 2017) e possuir um efeito inibitório da diferenciação dos osteócitos e da atividade dos osteoclastos (Haung et al., 2019). Também foi observada exacerbação do processo inflamatório quando comparados a PE-SS/SS aos 28 dias. Contudo, apesar da intensa inflamação local, ambos os grupos que receberam ZOL apresentaram perda óssea mínima, inconsistente com os danos causados pela PE.

Embora seja descrito na literatura que o ZOL possui a capacidade de aumentar a densidade óssea, alterações significativas no volume ósseo não são presentes na maioria dos estudos, como mostra Chavassieux et al., em 1997, ao realizar medições em biópsias ósseas transilíacas. O aumento da densidade ocorre devido à mineralização adicional da matriz óssea, à medida que mais moléculas de água são substituídas por minerais (Boivin et al., 2000). Ao contrário dos osteoclastos, os osteoblastos não são diretamente inibidos pelo ZOL. Sendo assim, durante os primeiros 3 a 6 meses, o osso continua a preencher as cavidades de reabsorção que estavam presentes quando a administração do medicamento foi iniciada, aumentando modestamente o volume ósseo (Chavassieux et al., 1997), o que foi constatado neste estudo pelo aumento da POF em PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL. Estes achados apontam para uma diminuição na diferenciação osteoclástica quando o ZOL é administrado isoladamente, como prevista na literatura (Huang et al., 2019),

porém, na presença somente da droga CIS, essa diferenciação é estimulada pelo processo inflamatório. Nesse contexto, pode ser inferido que em PE-CIS/ZOL a atividade reabsortiva é reduzida em decorrência do mecanismo de ação do ZOL.

Com relação à porcentagem de osso necrótico, o presente estudo identificou áreas de osso não-vital com a seguinte ordem de diferença dos valores de PON: PE-SS/SS < PE-CIS/SS < PE-SS/ZOL < PE-CIS/ZOL ($p < 0,05$). Nos animais que receberam CIS esse aumento de tecido ósseo não vital pode ser explicado pela citotoxicidade da droga exacerbado por um microambiente inflamado na presença de bactérias e seus produtos enzimáticos. Já, nos animais que receberam ZOL, a maior quantidade de tecido ósseo não vital, quando comparado com os demais grupos, é explicada pelo efeito da droga sobre a remodelação óssea. A atividade osteoclástica afeta negativamente o processo de remodelação, assim impede que ocorra a eliminação do tecido ósseo inviável e das microfraturas ósseas, comuns no tecido ósseo alveolar, afetando a homeostase dessa região, a qual apresenta uma alta taxa de renovação especialmente em função da atividade mastigatória, frente às dinâmicas de oclusão do sistema estomatognático, que necessita de uma resposta adaptativa constante do osso alveolar para promover a dissipação das forças (Araujo, 2017). Por isso, nos animais que receberam ambas as drogas os dois mecanismos podem ter sido combinados, potencializando seus efeitos prejudiciais e tornado possível observar maior PON, quando comparado com os demais grupos, aumentando o risco para desenvolvimento da ONM-m.

Observando clinicamente, fortes evidências indicam que a necessidade de exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical decorrente de distintas causas como cárie, progressão da periodontite, fraturas, dentre outros, combinado ao trauma e/ou inflamação/infecção são fatores predisponentes para o

desenvolvimento da ONM-m (Song, 2019). Na presença de drogas que exacerbam o processo inflamatório, como a CIS e drogas que estimulam a formação de tecido ósseo necrótico, como o ZOL, esses fatores são potencializados, conforme evidenciado pelo presente estudo.

A interpretação dos dados apresentados explica os mecanismos pelos quais a associação de CIS e ZOL amplificam os danos causados pelas medicações sobre os tecidos periodontais acometidos pela PE, quando comparados a sua utilização isolada no grupo placebo. Sabendo-se que a ONM-m, mesmo que de baixa incidência é potencialmente intratável (Song, 2019), os resultados deste estudo laboratorial inferem que em pacientes sob uso combinado de CIS e ZOL, principalmente quando acometidos pela periodontite, existe a necessidade de prevenção e manutenção de uma possível instalação da ONM-m.

5 Conclusão

Diante o exposto e dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que os efeitos do uso combinado de CIS e ZOL potencializam a progressão da periodontite experimental, além de ocasionarem a ocorrência de eventos osteonecróticos, aumentando o risco de ONM-m.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aghaloo, T.L., Kang, B., Sung, E.C., Shoff, M., Ronconi, M., Gotcher, J.E., Bezouglaia, O., Dry, S.M., Tetradis, S. (2011) Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *Journal of bone and mineral research* **26**, 1871-1882.
2. 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.
3. Aguirre, J.I., Akhter, M.P., Kimmel, D.B., Pingel, J.E., Williams, A., Jorgensen, M., Kesavalu, L., Wronski, T.J. (2012) Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *Journal of bone and mineral research* **27**, 2130-43.
4. Alani, A. & Seymour, R. (2014) Systemic medication and the inflammatory cascade. *Periodontology 2000* **64**, 198–210.
5. Allen, M.R., Burr, D.B. (2009) The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, **67**, 61-70.
6. 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.
7. Arias, J.L. (2008) Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. *Molecules* **13**, 2340-2369.
8. Bezerra, M.M., Brito, G.A., Ribeiro, R.A., Rocha, F.A. (2002) Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Brazilian journal of medical and biological research* **35**, 613-616.
9. Caton & Greestein, G.G. (1993) Factors related to periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. v. 1, p. 9-15.
10. 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.
11. Coleman, R.E. (2005) Bisphosphonates in breast cancer. *Annals of oncology* **16**:687–95.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. de Molon, R.S., de Avila, E.D., Cirelli, J.A. (2013) Host responses induced by different animal models of periodontal disease: A literature review. *Journal of investigative and clinical dentistry* **4**, 211-218.
16. Drake, M.T., Clarke, B.L., Khosla, S. (2008) Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic proceedings* **83**, 1032-1045.
17. 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.
18. Fernandes, L.A., de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Martins, T.M., Okamoto, T., Garcia, V.G. (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* **36**, 3:219-28.
19. Food and Drug Administration. Dose Calculator. Conversion Chemotherapy of Human to Animals. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
20. Furlaneto, F.A., Nunes, N.L., Oliveira Filho, I.L., Frota, N.P., Yamamoto, K.O., Lisboa, M.R., Ervolino, E., Taba, M. JR., Rêgo, R.O., Messoria, M.R. (2014) Effects of Locally-administered Tiludronic Acid on Experimental Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology* **85**, 1291-301.
21. 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.
22. Garcia, V.G., Longo, M., Gualberto Júnior, E.C., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Ervolino, E., Theodoro, L.H. (2014) Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* **49**, 584-94.

23. 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.
24. Graves, D. (2008) Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **79**, 1585–1591.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Half, E. & Arber, N. (2009) Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy***10**, 211-209.
29. 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.
30. Hillmann, G., Hillmann, B. & Geursten, W. (1995) Immunohistological determination of interleukin-1 beta in inflamed gingival epithelium. *Archives of Oral Biology***40**, 353-359.
31. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. (1990). The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 1, 60–68.
32. Hortobagyi, G.N. (2005) Progress in the management of bone metastases: one continent at a time? *Journal of clinical oncology***23**:3299–301.
33. INCA - Instituto Nacional do Câncer, Estimativa 2014 - Secretaria da Saúde.. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>.
34. 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.
35. Kang, B., Cheong, S., Chaichanasakul, T., Bezouglaia, O., Atti, E., Dry, S.M., Pirihi, F.Q., Aghaloo, T.L., Tetradis, S. (2013) Periapical disease and

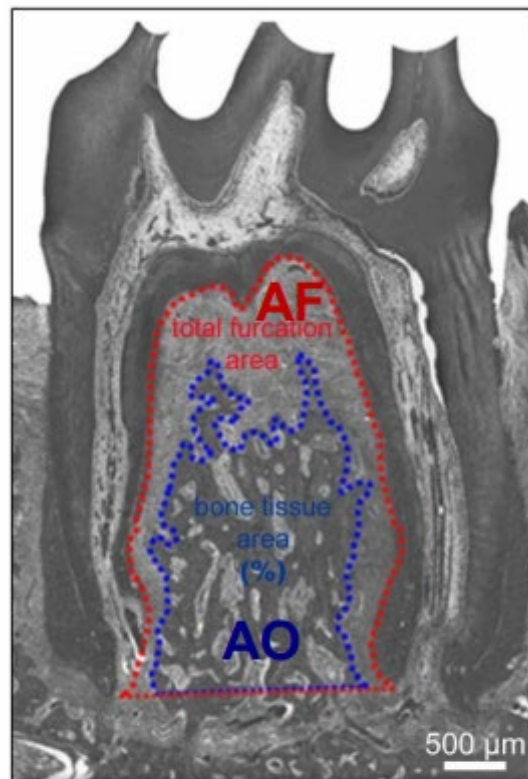
- bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *Journal of bone and mineral research*. **28**:1631-40.
36. Kim, S.S., Jackson-Boeters, L., Darling, M.R., Rieder, M.J., Hamilton, D.W. (2013) Nifedipine induces periostin expression in gingival fibroblasts through TGF-beta. *Journal of Dental Research***92**, 1022-1028.
 37. 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.
 38. Li, Y., Lu, Z., Zhang, X., Yu, H., Kirkwood, K.L., Lopes-Virella, M.F., Huang, Y. (2015) Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *Journal of dental research***94**, 362-70.
 39. 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.
 40. Listgarten, M.A. (1975) Similarity of relationships in the gingiva of rats and man. *Journal of Periodontology***46**, 687-80.
 41. 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.
 42. Lorch, J.H., Goloubeva, O., Haddad, R.I., Cullen, K., Sarlis, N., Tishler, R., Tan, M., Fasciano, J., Sammartino, D.E., Posner, M.R. (2011) TAX 324 Study Group. 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 TAX324 randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. **12**, 153-9.
 43. McGuire, D.B. (2002) Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than mucositis and mouthwash. *Cancer Practice***10**, 179-91.
 44. Mihai, R. (2015) Diagnosis, treatment and outcome of adrenocortical cancer. *The British Journal of Surgery***102**, 291-306.
 45. 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.

46. 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.
47. Nakib, N. & Ashrafi, S.S. (2011) Drug-induced gingival overgrowth. *Disease-a-month*. **57**, 225-230.
48. 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.
49. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *The Journal of physiology***588**, 2519-2521.
50. 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.
51. Pavone, C., Perussi, L.R., De Oliveira, G.J., Scardueli, C.R., Cirelli, J.A., Cerri, P.S., Junior, E.M., Spolidorio, L.C., Marcantonio, R.A. (2015) Effect of Er,Cr:YSGG laser application in the treatment of experimental periodontitis. *Lasers in medical science***30**, 993-9.
52. Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., et al. (2009) Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: Bone loss and host response. *Journal of Clinical Periodontology***36**, 406-410.
53. Preshaw, P.M. (2013) Oral contraceptives and the periodontium. *Periodontology* **2000****61**, 125-159.
54. 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.
55. Ruggiero, S.L., Dodson, T.B. (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws- 2014 Update. *Journal of oral and maxillofacial surgery***72**, 2381-2.
56. Russell, R.G. (2011) Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* **49**, 2-19.
57. Saltz, L.B. & Kemeny, N.E. (1996) Adjuvant Chemotherapy of Colorectal Cancer. *The Oncologist***1**, 22-29.
58. Seymour, R.A. (2006) Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* **2000****40**, 120-129.

59. 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.
60. 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.
61. Tatakis, D.N., Guglielmoni, P. (2000) HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. *Journal of Periodontology***71**, 1395-400.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. Wang, D. & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 4, 307-320. doi: 10.1038/nrd1691
67. Winter, M. C., Wilson, C., Syddall, S. P., Cross, S. S., Evans, A., Ingram, C. E., Jolley, I. J., Hatton, M. Q., Freeman, J. V., Mori, S., Holen, I., & Coleman, R. E. (2013). Neoadjuvant chemotherapy with or without zoledronic acid in early breast cancer - a randomized biomarker pilot study. *Clinical Cancer Research*, 19, 2755-2765. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3235
68. 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. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.04.005

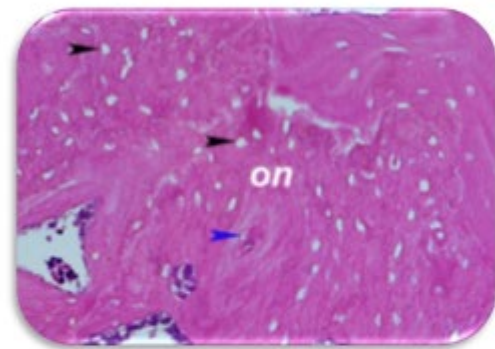
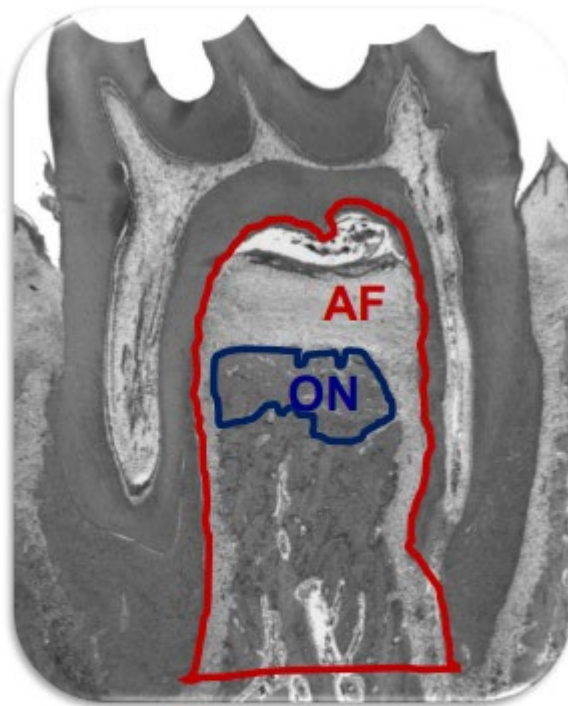
69. Zhao, Y. Y., Xue, C., Hou, X., Liao, H., Li, S., Zhao, H. Y., Huang, Y., Chen, L. K., Xu, F., Liu, J. L., & Zhang, L. (2011). Changes of bone resorption marker (NTX) in chemotherapy plus zoledronic acid versus chemotherapy alone for nasopharyngeal cancer patients with bone metastases. *European Journal of Cancer*, 47, 848-853. doi: 10.1016/j.ejca.2010.12.004

Anexo A – Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica POF.



$$\text{POF} = (\text{AO} \times 100) / \text{AF}$$

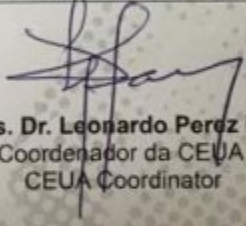
Anexo B – Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica PON



Área considerada necrosada com
ausência de osteócito

$$\text{PON} = (\text{ON} \times 100) / \text{AF}$$

Anexo C – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals		
CERTIFICADO		
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à dose oncológica de zoledronato e a quimioterapia", Processo FOA nº 00608-2017, 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 16 de Agosto de 2017.		
VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 09 de Abril de 2020.		
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 09 de Maio de 2020.		
CERTIFICATE		
We certify that the study entitled "Immunoinflammatory response in induced experimental periodontitis in rats submitted to an oncologic dose of zoledronate and chemotherapy", Protocol FOA nº 00608-2017, 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 16, 2017.		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 09, 2020.		
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 09, 2020.		
		
Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani Coordenador 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		