



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia

OTAVIO MARINO DOS SANTOS NETO

EFEITO DO *LACTOBACILLUS REUTERI* NO TRATAMENTO
DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTALMENTE
INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA
COM 5-FLUOROURACIL: ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Araçatuba – SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia

OTAVIO MARINO DOS SANTOS NETO

**EFEITO DO *LACTOBACILLUS REUTERI* NO TRATAMENTO
DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTALMENTE
INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA
COM 5-FLUOROURACIL: ANÁLISE HISTOMÉTRICA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Helena Theodoro

Araçatuba – SP

2016

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Luiz e Iraci, que com o seu amor incondicional sempre tornaram minhas tristezas menos intensas e minhas alegrias mais duradouras nesta grande jornada que é a vida. Pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis da graduação, onde mesmo que a distância vocês foram capazes de me amparar. Ao longo desses anos vocês se esforçaram muito para que eu pudesse realizar o sonho de terminar a faculdade, muitas vezes abdicando de seus próprios sonhos para realizar os meus. Vocês foram os meus maiores exemplos de amor e carinho, sendo extremamente compreensíveis diante às minhas escolhas. Seus ensinamentos sempre encontrarão lugar em meu coração.

Tudo só foi possível, por que tive vocês ao meu lado...

Amo vocês!

Aos meus irmãos André e Lilian, eu agradeço todos os dias por Deus ter colocados vocês em minha vida. Diante das adversidades vocês foram o ponto de equilíbrio em nossa família. Sempre amigos, sendo essenciais para que os meus sonhos se tornassem realidade. Agradeço a vocês pelos esforços que fizeram junto aos nossos pais quando tudo parecia muito difícil.

Vocês foram os meus maiores exemplos...

Obrigado por tudo!

Aos meus sobrinhos Inaile e Breno, que compreenderam minha ausência e que sempre me recebiam cobrindo-me de abraços e carinho. Vocês são o meu esteio, meu refúgio, o meu maior orgulho. Amo vocês.

Agradeço a Deus por vocês existirem na minha vida...

Meus pequenos!

A minha tia Maria Clara, por estar sempre do meu lado, por se preocupar comigo e ser uma segunda mãe na minha vida. Você foi muito importante para que tudo acontecesse, estando presente na minha vida, e me apoiando desde o vestibular até os momentos finais da graduação.

Sem você nossa família nada seria...

Você é incrível!

Ao meu amigo Gabriel, que mesmo à distância, me confortava e me alegrava, amigo, fiel, compreensivo...

A todos os meus alunos e companheiros do Cursinho Pré-Vestibular DACA, onde eu realmente me encontrei e tive uma das melhores experiências da minha vida. Vocês foram essenciais nos momentos mais difíceis.

Sem vocês, nada teria sido como foi...

Aos meus amigos e colegas de turma, Geórgia, Cadu, Rodolfo, Amanda, Izabella, Nairobi, Janayna, Bruna, Marinhinha, Camila Ramos, Camila Telles, Carol, Denise, Flávia, Gabi, Giovana, Juliana, Larissa, que me proporcionaram momentos tão felizes e descontraídos, deixando a graduação mais leve e divertida.

Nunca vou me esquecer dos nossos momentos juntos...

As minhas amigas Daniela e Karina, que entraram na minha vida em uma fase tão difícil e foram capazes de me proporcionar momentos dos quais eu nunca esquecerei. Nunca vou esquecer dos nossos estudos de anatomia, das nossas noites

mal dormidas, das jantinhas na casa de vocês... Vocês que em diversos momentos me deram colo, carinho...

Vocês foram e sempre serão os presentes da minha vida!

A minha amiga Yara, pela grande companhia nesses últimos anos de faculdade, pela sua paciência, sabedoria e simplicidade. Mais do que companheira, você foi minha confidente, aquela que me deu grandes conselhos. Seu sorriso e abraços alegam meu dia-a-dia.

Aonde quer que eu vá, sei que estará me apoiando...

Parceira...

Aos amigos que a Unesp me proporcionou, Victor, Marisa, Hugo, Paulinha, Hiskell, Amanda, Pedro, Afonso, Ana Flávia, Priscilla, Walter, Rebecca, Guilherme, Matheus, Tiago, Sandy, Débora, Kethellen, Karina, pela companhia e alegria que sempre fizeram dos meus dias aqui, dias melhores.

Sem amigos, eu nada seria

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. João Eduardo Gomes Filho.

À Prof. Dra. Leticia Helena Theodoro, por ter dado a primeira oportunidade de me iniciar na pesquisa, assim que chegou nesta faculdade ter me abriu as portas da sua sala para que pudéssemos trabalhar juntos. Sua trajetória de sucesso muito me inspira. Você soube como conduzir minha orientação, sabendo dosar a hora em que eu precisava de um —~~pa~~ção de orelha” e a hora que eu precisava de uma palavra de tranquilidade. Obrigado pela confiança em mim depositada, pela paciência, generosidade com as quais sempre me recebeu. Exemplo de profissional que todos devemos seguir, a sua orientação foi extremamente importante para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Obrigado por tudo! Você acreditou no meu trabalho e isso me deu força para conseguir executá-lo.

À Prof. Dra. Adriana Cristina Zavanelli, amiga, conselheira, orientadora, que me possibilitou diversas oportunidades na graduação, sempre me tratando com muito carinho. Você é um grande exemplo que sempre há pessoas boas nesse mundo. Sua história e carreira me inspiram. Sem você, com certeza eu não teria tanta certeza do amor que eu tenho pela profissão que escolhi. Sua alma é generosa, e tudo que você faz é com o coração. Obrigado por tudo.

À Prof. Dra. Ana Maria Pires Soubhia. Exemplo de pessoa pela sua generosidade e pelo amor pelo que faz. Não soube medir esforços para me ajudar nos momentos em que eu precisei. Foi uma oportunidade única trabalhar ao seu lado. Muito obrigado por tudo professora.

Aos pós-graduandos do programa de pós graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia Daniela, Marta, Márcio e Vivian que me auxiliaram em todos os momentos para execução desse trabalho. Sem a colaboração e paciência de vocês nada seria possível. Agradeço também ao colega de graduação Victor, por sua ajuda nas atividades de biotério.

Ao coordenador de curso, Eloi Dezan Junior, que atendeu prontamente as solicitações necessárias ao longo desse trabalho.

Aos professores da disciplina de Periodontia, Juliano Milanezi de Almeida e Valdir Gouveia Garcia, pela inestimável ajuda nos procedimentos de biotério desse trabalho, durante a colocação de ligaduras nos animais.

Aos professores da graduação, Sônia Regina Panzarini, José Vitor Quinelli Mazaro, Maria Cristina Rosifini Alves-Rezende, Paulo Roberto Botacin, Karina Helga Turcio Carvalho, Humberto Gennari Filho, Daniela Atili Brandini, Kikue Takebayashi Sasaki, Ana Paula Farnezi Bassi, Eloá Rodrigues Luvizuto, Robson Frederico Cunha, Sandra Maria Herondina Ávila de Aguiar, pelos ensinamentos compartilhados durante a graduação, sendo sempre grandes mestres, contribuindo com a minha formação de forma inestimável.

Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação, Marie, Tânia e Fábila, pela amizade e colaboração, sempre me ajudando prontamente nas dúvidas quanto ao trabalho.

A funcionária da biblioteca, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, pela ajuda na formatação e inserção de referências bibliográficas a este trabalho.

A Pró-reitoria de Pesquisa da Unesp (PROPE), por ter me concedido uma bolsa de iniciação científica para a execução deste trabalho.

"Renova-te.

Renasce em ti mesmo.

Multiplica os teus olhos, para verem mais.

Multiplica-se os teus braços para semeares tudo.

Destrói os olhos que tiverem visto.

Cria outros, para as visões novas.

Destrói os braços que tiverem semeado, Para se esquecerem de colher.

Se sempre o mesmo.

Sempre outro.

Mas sempre alto.

Sempre longe.

E dentro de tudo."

Cecília Meireles

SANTOS NETO, O.M. **Efeito do *Lactobacillus reuteri* no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil: análise histométrica.** 2016. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar por meio de análise histométrica, os efeitos do uso sistêmico do probiótico (PRO) *Lactobacillus reuteri*, no tratamento da periodontite experimental (PE) em ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil. 54 ratos foram submetidos à indução da periodontite experimental (PE). O 5-FU foi injetado nos animais no dia da instalação da ligadura (60 mg/kg) e 48 horas após (40 mg/kg). Após 7 dias da indução, a ligadura foi removida e os animais foram divididos em 3 grupos de 18 animais cada: Grupo 5-FU/PE: animais tratados apenas com 5-FU, sem tratamento local; Grupo 5-FU/PE/RAR: animais tratados com 5-FU e RAR; Grupo 5-FU/PE/PRO: animais tratados com 5-FU, RAR e 4 gavagens, com intervalo de 48 horas de *Lactobacillus reuteri* (5-FU/PE/PRO). Os animais foram submetidos à eutanásia nos intervalos de 7, 15 e 30 dias após os tratamentos. As amostras da hemi-mandíbula sofreram processamento histológico e foram coradas com Hematoxilina e Eosina. A área de perda óssea (PO) na região de furca do primeiro molar foi analisada histometricamente. Os dados foram submetidos à análise estatística ($\alpha = 5\%$). Na análise dos dados histométricos observou-se que houve menor PO nos animais do Grupo 5-FU/PE/PRO, quando comparados aos grupos 5-FU/PE e 5FU/PE/RAR, aos 7, 15 e 30 dias. Concluiu-se que a terapia sistêmica com *Lactobacillus reuteri*, como coadjuvante à RAR é efetiva no tratamento da PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Palavras Chave: Periodontite. Quimioterapia. Probióticos.

SANTOS NETO, O.M. **Effect of *Lactobacillus reuteri* in the treatment of experimental periodontitis in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy: histometric analysis.** 2016. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate by histometric analysis, the effects of the systemic use of the probiotic (PRO) *Lactobacillus reuteri* in the treatment of experimental periodontitis (EP) in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. 54 rats were subjected to induction of experimental periodontitis (EP). The 5-FU was injected into the animals on the day of ligation installation (60 mg / kg) and 48 hours later (40 mg / kg). After 7 days of induction, the ligature was removed, and the animals were divided into 3 groups of 18 animals each: Group 5-FU/EP: animal treated with 5-FU and no local treatment; Group 5-FU/EP/SRP: animal treated with 5-FU and SRP; Group 5-FU/EP/PRO: animals treated with 5-FU, SRP and 4 gavagens with an interval of 48 hours of *Lactobacillus reuteri*. The animals were euthanized at intervals of 7, 15 and 30 days after treatment. Samples of the hemi-jaw underwent histological analysis and stained with Hematoxylin and Eosin. The area of bone loss (BL) in the furcation region of the molar was histometrically analyzed. The data were submitted to statistical analysis ($\alpha = 5\%$). The analysis of histometric data revealed that BL was lower in animals of 5-FU/EP/PRO group compared to 5-FU/EP and 5-FU/EP/SRP groups at 7, 15 and 30 days. It was concluded that systemic therapy using *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to SRP is effective in the treatment of EP in rats subjected to 5-FU chemotherapy.

Keywords: Periodontitis. Chemotherapy. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos do grupo 5-FU/PE (A), 5-FU/PE/RAR (B) e 5-FU/PE/PRO (C) aos 7 dias. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 50x. 27
- Figura 2 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos do grupo 5-FU/PE (A), 5-FU/PE/RAR (B) e 5-FU/PE/PRO (C) aos 14 dias. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 50x. 27
- Figura 3 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos do grupo 5-FU/PE (A), 5-FU/PE/RAR (B) e 5-FU/PE/PRO (C) aos 30 dias. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 50x. 28

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Média $\pm$ DP dos dados histométricos da PO (mm ²) na região de	26
-	furca do primeiro molar inferior do lado esquerdo de acordo com grupos e períodos de avaliação.	

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU 5-Flourouracil

RAR Raspagem e alisamento radicular

PE Periodontite experimental

DP Doença periodontal

PO Perda óssea

PRO Probióticos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	PROPOSIÇÃO	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Tratamento quimioterápico com 5-Fluorouracil	16
3.2	Terapia periodontal não cirúrgica	16
3.3	O uso de probióticos em Odontologia	18
3.3.1	Ensaio clínico em humanos	19
3.3.2	Estudos envolvendo animais	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	Animais	22
4.2	Procedimentos experimentais	22
4.2.1	Indução da periodontite experimental (PE)	22
4.2.2	Tratamento com 5-FU	23
4.2.3	Grupos experimentais	23
4.2.4	Tratamento com raspagem e alisamento radicular	23
4.2.5	Tratamento com probiótico	24
4.3	Eutanásia e obtenção das amostras	24
4.4	Processamento histológico	24
4.5	Análise histométrica	25
4.6	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO	44

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais caracterizam-se por serem processos infecciosos e inflamatórios que levam a destruição dos tecidos de suporte dos dentes. São patologias multifatoriais que afetam de 30 a 50% da população adulta e são causadas por microorganismos periodontopatogênicos, influenciados por fatores locais e sistêmicos que alteram a resposta do hospedeiro frente à agressão microbiana (ANDERSEN et al., 2007).

Importantes estudos relatados na literatura chamam a atenção que na relação doença-bactéria, diferentes condições devem ser consideradas como: a susceptibilidade do hospedeiro, a presença de bactérias periodontopatogênicas e a redução ou ausência de bactérias benéficas ao ecossistema da bolsa (SLOT; RAMS, 1991; HAFFAJEE, 1992; WOLFF et al., 1994). As doenças periodontais podem estar associadas com várias condições sistêmicas, que podem interferir na resposta inflamatória do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2008; GARCIA et al., 2011) e alterar a cicatrização após a terapia periodontal (JAVED et al., 2010, 2012; CHANG, 2012).

A quimioterapia e radioterapia, além das cirurgias ressectivas são as intervenções mais utilizadas para o tratamento de câncer (NAIDU et al., 2004) e é comum produzirem alterações na cavidade bucal, como a mucosite oral, ulcerações, sangramento gengival, hipofunção da glândula salivar (DREIZEN, 1978; EPSTEIN et al., 2002; JENSEN et al., 2003; SONIS et al., 2004), inibição nos queratinócitos do epitélio oral (VON BULTZINGSLOWEN et al., 2001) e alterações no tecido conjuntivo e no ambiente microbiano bucal (SCULLY et al., 2006). Estas alterações resultam na destruição da mucosa bucal, que é uma barreira física, que previne a penetração de bactérias entéricas, vírus e fungos nos tecidos bucais (EDUARDO et al., 2009; LOPES et al., 2009; LOPES et al., 2010; SACONO et al., 2008). O provável mecanismo associado com o desenvolvimento da mucosite oral causada pela quimioterapia envolve eventos biológicos complexos, mediados por várias citocinas pró-inflamatórias tais como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL-1 e IL-6) (GUIMARÃES et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011). Desta forma, a ulceração na cavidade bucal resulta em um risco aumentado de infecção, particularmente durante a imunossupressão (ZEGARELLI, 1993). Estes mediadores

inflamatórios podem aumentar a expressão de RANKL (Receptor ativador de NF-Kappa B ligante), enquanto diminui a produção de OPG (Osteoprotegerina) em osteoblastos (NAKASHIMA et al., 2000), causando destruição nos tecidos periodontais, incluindo o osso alveolar (COCHRAN, 2008; GARLET et al., 2010).

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma droga muito utilizada no tratamento dos carcinomas (ARIAS, 2008), causando imunossupressão sistêmica, porém danifica a integridade epitelial da cavidade bucal. O 5-FU é um análogo da pirimidina uracila que adiciona um átomo de flúor na posição 5, substituindo um átomo de hidrogênio, danificando células malignas de duas formas: por inibição do timidilato sintase e conversão intracelularmente a nucleotídeos ativos que interferem com a síntese de RNA e DNA (MAZZEO et al., 2009). Estudos têm demonstrado que o 5-FU causa morte celular por apoptose em tecidos (IJIRIC et al., 1983; PRITCHARD et al., 1999), e em linhas de células epiteliais (TONG et al., 2000; NOORDHUIS et al., 2004). O 5-FU também tem efeito direto sobre o epitélio basal, tecido conjuntivo e microbiota bucal (SCULLY et al., 2006), além de agravar a progressão da periodontite experimental (PE), promovendo maior perda óssea alveolar com necroses ósseas extensa (GARCIA et al., 2015). A redução e o controle de microrganismos periodontopatogênicos na terapia periodontal, pode ser realizada pela raspagem e alisamento radicular (RAR), (KALDAHL et al., 1993; SOUKOS; GOODSON, 2011). Entretanto, somente a terapia mecânica de RAR, pode ser insuficiente para eliminar as bactérias patogênicas devido as suas localizações no interior dos tecidos moles, duros ou em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais como áreas de furca e depressões radiculares (MATIA et al., 1986; ADRIAENS et al., 1988). Estudo recente em animais demonstrou que a RAR não é efetiva para o tratamento de PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU, sugerindo o uso de terapias coadjuvantes em condições de imunossupressão (GARCIA et al., 2015).

Estas limitações e o melhor entendimento biológico das doenças periodontais juntamente com a especificidade bacteriana, tem levado muitos pesquisadores a buscarem métodos coadjuvantes ao tratamento de RAR, que promovam a eliminação de patógenos periodontais, como é o caso dos antibióticos ou antissépticos (RAMS; SLOTS, 1996). Porém, nota-se na literatura relatos que atestam a possibilidade de haver resistência e seleção bacteriana promovida pelo

uso indiscriminado de antimicrobianos na terapêutica periodontal (SLOTS; RAMS, 1991).

Pesquisas recentes têm demonstrado a possibilidade do uso clínico do probiótico (PRO) *Lactobacillus*, com efeitos sob a microbiota gengival (INIESTA et al., 2012; MAYANAGI et al., 2009; TEANPAISAN et al., 2011), na inflamação gengival (KRASSE et al., 2006; STAAB et al., 2009) e no tratamento da periodontite (TSUBARA et al., 2009; VIVEKANANDA et al., 2010). Acredita-se que a utilização de PRO no tratamento periodontal poderia minimizar os efeitos da ausência ou redução de bactérias benéficas em bolsas periodontais. Os probióticos, além de controlar o ecossistema microbiano da área, através de mecanismo de exclusão competitivo, possuem outros efeitos fundamentais como: capacidade de interferir na modulação imunológica, modulando a defesa do hospedeiro, tanto a resposta inata como a resposta adquirida; atua também na permeabilidade epitelial; na translocação bacteriana e na liberação de metabólitos bioativos ou regulatórios, que possuem a capacidade de produção de substâncias antibacterianas contra periodontopatógenos (de VRESE; SCHREZENMEIR, 2008; TEUGHELIS et al., 2011). Contudo, há poucos estudos experimentais que avaliam o efeito do probiótico local e sistêmico na doença periodontal induzida em animais (TEUGHELIS et al., 2007; MESSORA et al., 2013; FOUREAUX et al., 2014; MAEKAWA et al., 2014 GARCIA et al., 2015).

Estudos em animais demonstraram que o uso local ou sistêmico de probióticos reduz a perda óssea (PO), melhora a inflamação, aumenta a efetividade da terapia mecânica de raspagem e alisamento radicular (RAR), reduz a recolonização de áreas com periodontite induzida por periodontopatógenos, assim como a quantidade de bactérias anaeróbicas e citocinas pro-inflamatórias (TEUGHELIS et al., 2007; MESSORA et al., 2013; FOUREAUX et al., 2014; MAEKAWA et al., 2014 GARCIA et al., 2015). No entanto não há relatos na literatura sobre o uso de PRO como terapia coadjuvante ao tratamento da periodontite agravada pela quimioterapia.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar por meio de análise histométrica, os efeitos do uso sistêmico do *Lactobacillus reuteri*, no tratamento da PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tratamento quimioterápico com 5-Fluorouracil

Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016) haverá 596.070 novos casos de neoplasias malignas no território nacional, dentre esses 61200 serão tumores de próstata, 57.960 tumores de mama e 22.780 serão lesões de tecido sanguíneo (leucemias e linfomas). Os tumores da cabeça e do pescoço representam o quinto câncer mais frequente no mundo, sendo estimado que anualmente ocorram 500.000 novos casos (GRANSTRÖM, 2005), sendo que só no Brasil as estimativas para 2016 são de 15.490 novos casos (INCA, 2016). A radioterapia, quimioterapia e excisão cirúrgica são as três modalidades terapêuticas que combinadas ou usadas isoladamente constituem o tratamento de tumores malignos (BUDDULA et al., 2012).

A quimioterapia baseia-se na administração sistêmica de fármacos dirigidos contra certos grupos moleculares e o objetivo das drogas usadas em quimioterapia é destruir ou causar um atraso na divisão das células com proliferação acelerada (PETERSON et al., 2005). Os fármacos agem tanto nas células tumorais, como nas células com metabolismo acelerado como, por exemplo, as células do epitélio gastrointestinal, incluindo as da cavidade bucal (PETERSON et al., 2005).

Os agentes quimioterapêuticos atrasam a migração das células para o local danificado, diminuem a formação da matriz de reparo no dano tecidual, reduzem a produção de colágeno, comprometem a proliferação de fibroblastos e inibem a contração das feridas (GUO et al., 2010). Além disto, enfraquecem o sistema imunológico do paciente, impedindo a resposta mune inflamatória das feridas aumentando assim a possibilidade de infecção (GUO et al., 2010). Alguns dos efeitos sistêmicos causados pela quimioterapia são: fadiga geral, astenia, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, hipotireoidismo, hiperglicemia, toxicidade cardíaca e toxicidade dermatológica (BARTON, 2011). Estes fármacos induzem neutropenia, anemia e trombocitopenia, tornando a zona da ferida mais vulnerável e mais susceptível a hemorragia descontrolada (GARG; GUEZ, 2011). Como efeito secundário tardio, as alterações vasculares, causadas pelos agentes quimioterapêuticos, conduzem à má-nutrição óssea, o que leva a um estado

semelhante à osteoporose (KOVÁCS, 2001), tornando assim necessário a investigação sobre seus efeitos na osseointegração.

Os fármacos quimioterapêuticos mais frequentemente administrados são: 5-Fluororacil (5-FU), cisplatina, metotrexato, bleomicina e vincristina (GRANSTRÖM, 2005, 2007).

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma droga muito utilizada no tratamento dos carcinomas, que causa imunossupressão sistêmica e danifica a integridade epitelial da cavidade bucal (BÜLTZINGSLÖWEN; JONTELL, 1999). O 5-FU é um análogo da pirimidina uracila e é convertido intracelularmente a nucleotídeos ativos que interferem com a síntese de RNA e DNA. Vários estudos tem demonstrado que o 5-FU causa morte celular por apoptose em tecidos, e em linhas de células epiteliais (TONG et al., 2000) e a mucosite oral é uma das complicações mais comuns. O provável mecanismo da mucosite oral causada pela quimioterapia envolve eventos biológicos complexos mediados por várias citocinas inflamatórias tais como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL-1 e IL-6). A quimioterapia também tem efeito direto sobre o epitélio basal, tecido conjuntivo, microbiota bucal (SCULLY et al., 2006) e na progressão da periodontite (GARCIA et al., 2015).

Garcia et al. (2015) através de estudo inédito, avaliaram os efeitos do 5-Fluororacil na periodontite experimental. Concluíram que o 5-FU exacerbou a gravidade da periodontite experimental, comprometendo a resposta do hospedeiro à terapia mecânica e não causou alterações no periodonto saudável. Os autores salientam a importância de estudos adicionais para estabelecer terapias adjuvantes que podem melhorar a eficácia do tratamento periodontal durante um regime de tratamento com este agente quimioterapêutico.

3.2 Terapia periodontal não cirúrgica

A doença periodontal é uma patologia infecciosa, modulada pela resposta inflamatória do indivíduo, tendo o biofilme dental como fator etiológico desta doença que sofre influencia de vários fatores locais como restaurações insatisfatórias, presença de cálculo salivar, e também de fatores sistêmicos como a obesidade, diabetes, fator genético e uso de tabaco, imunodepressão do indivíduo (KISS et al., 2010; SOUZA et al., 2010, 2011).

Os principais objetivos da terapia periodontal são redução da inflamação, por meio da remoção dos microrganismos presentes subgengivalmente no cálculo, cemento e dentina contaminada, ganho de inserção clínica, além da manutenção dos níveis de inserção estáveis ao longo do tempo (ZANDBERGEN et al., 2012). É realizada por meio do debridamento radicular com diversos instrumentos raspadores, consultas de motivação e instrução de higiene bucal. Entretanto, para atingir esses objetivos há diferentes modalidades terapêuticas, entre as quais, raspagem através de acesso cirúrgico (PAUL et al., 2010; RAMFJORD et al., 1975) e não-cirúrgico (APATZIDOU et al., 2010), raspagem associada a antibióticos (AIMETTI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012) e as terapias coadjuvantes, como a terapia fotodinâmica (GARCIA et al., 2013; THEODORO et al., 2015, 2016) e a utilização de probióticos (GARCIA et al., 2015; GIZEM et al., 2015; MESSORA et al., 2016).

Segundo Claffey e Polyzois (2008) a instrumentação manual e mecânica não cirúrgica em associação com instruções de higiene oral são a base de tratamento da doença periodontal.

Serino et al. (2001) afirmaram que vários estudos de longo prazo mostram que a sequência da doença periodontal pode ser tratada através de tratamentos que envolvem o autocontrole de placa e RAR tanto em indivíduos com periodontite moderada como em casos de periodontite avançada destrutiva. Portanto, a terapia não-cirúrgica deve ser a primeira abordagem na tentativa de restabelecer uma boa saúde periodontal e retardar o processo da doença.

A terapia não-cirúrgica baseia-se na RAR em conjunto com instruções de higiene oral e segundo eles, resulta num ganho de inserção da margem gengival uma vez que elimina a inflamação de periodonto (KEESTRA et al., 2015), seu objetivo é proporcionar um meio através do qual o hospedeiro possa prevenir a recolonização de microrganismos, utilizando métodos de higiene oral individuais (CLAFFEY; POLYZOIS, 2008);

3.3 Uso de Probióticos em Odontologia

A recolonização frequente de sítios tratados por periodontopatógenos e o surgimento de resistência aos antibióticos levaram a uma chamada para novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças periodontais. Probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; SANDERS, 2003).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

Os probióticos mais empregados na saúde humana são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os lactobacilos são bactérias Gram-positivas acidófilas que fazem parte da microbiota humana colonizando várias partes do corpo. (MEURMAN; STAMATOVA, 2007).

Na Odontologia, os probióticos têm sido utilizados em diferentes áreas da saúde oral como na halitose (BURTON et al., 2005), candidíase oral (HATAKKA et al., 2007), cárie dentária (STECKSEN-BLICKS et al., 2009), bem como na gengivite e na periodontite. Nessa revisão abordaremos ensaios clínicos em humanos e posteriormente, estudos envolvendo animais.

3.3.1 Ensaios clínicos em humanos

Em ensaios clínicos em humanos, como o de Vivekananda et al. (2010) avaliaram os efeitos do uso isolado do *Lactobacillus reuteri* e associado com raspagem e alisamento radicular (RAR) em um estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controle em voluntários portadores de periodontite crônica. Os autores concluíram que o *L. reuteri* inibe a formação da placa, possui ação anti-inflamatória e antimicrobiana, sugerindo o seu uso como terapia adjuvante ou alternativa ao tratamento periodontal, quando o procedimento de RAR é contraindicado, podendo ser útil também na fase de manutenção do tratamento periodontal.

Iniesta et al. (2012) avaliando os efeitos do probiótico *L. reuteri* administrado via oral sobre a microbiota oral, encontraram redução da quantidade de anaeróbios na saliva após 4 semanas e na quantidade de *P. intermedia* após 8 semanas, com maior redução no grupo teste. Houve significativa redução na quantidade de *P. gingivalis* em amostras de placa subgengival entre os períodos baseline e 4 semanas. Houve redução da quantidade de patógenos periodontais na microbiota subgengival sem evidenciar um impacto clínico associado.

Szkaradkiewicz et al. (2014) avaliaram a resposta citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-17) em pacientes com periodontite crônica, quando da administração de uma cepa probiótica de *Lactobacillus reuteri*. Os resultados obtidos no estudo indicaram que a aplicação do tratamento oral com os comprimidos que contêm a estirpe probiótica de *L. reuteri* induz na maioria dos pacientes com periodontite crônica uma redução significativa da resposta de citocina pró-inflamatória e melhoria dos parâmetros clínicos periodontais.

O estudo de Ince et al. (2015) avaliou os efeitos do probiótico *Lactobacillus reuteri* sobre parâmetros clínicos e bioquímicos a terapia inicial periodontal em pacientes com periodontite crônica. Concluíram que a terapia adjuvante com probiótico foi capaz de proporcionar benefícios adicionais durante a terapia periodontal inicial tanto em parâmetros clínicos quanto bioquímicos.

3.3.2 Estudos envolvendo animais

O número de pesquisas experimentais em animais utilizando bactérias probióticas é limitado. São relatadas pesquisas desenvolvidas em ratos (FOUREAUX et al., MESSORA et al., 2013; 2013, GARCIA et al., 2015).

Messora et al. (2013) avaliaram a influência da suplementação com probiótico na periodontite experimentalmente induzida e na morfologia intestinal de ratos. Utilizaram 32 ratos divididos randomicamente em 4 grupos : Controle, animais sem ligadura e sem administração sistêmica do probiótico; PROB - animais sem ligadura, que receberam administração sistêmica de probiótico; Periodontite – animais portadores de periodontite induzida, sem administração sistêmica do probiótico; Periodontite/PROB – animais portadores de periodontite induzida e receberam administração sistêmica do probiótico. O probiótico utilizado (*Bacillus subtilis* - CH₂O₁) foi administrado diariamente na água de hidratação dos animais, com concentração de 1.5×10^8 UFC/ml durante 44 dias. Foram avaliadas perda de inserção, nível do osso alveolar e amostra do duodeno dos animais. Os autores concluíram que a suplementação com probióticos reduziu a perda óssea e a perda de inserção periodontal, além de proteger o intestino delgado de reações provocadas pela doença periodontal.

Foureaux et al. (2013) avaliaram os efeitos da terapia probiótica sobre parâmetros metabólicos e inflamatórios em animais portadores de doença periodontal induzida associados a condições de estresse por imobilização. Sessenta e quatro animais foram divididos em 8 grupos: Controle, Estresse, Probiótico, Doença periodontal, Estresse + Probiótico, Estresse + Doença periodontal, Estresse + Doença periodontal + Probiótico, Doença periodontal + Probiótico. O estresse foi provocado por imobilização dos animais durante 2 horas e 30 minutos por dia durante 30 dias e a bactéria probiótica utilizada foi o *B. subtilis* (CH₂O₁) administrado na água, na concentração de 1.5×10^8 UFC/ml durante 44 dias. Os resultados deste estudo evidenciaram que o uso de probiótico pode diminuir a atividade osteoclástica, prevenindo a perda óssea periodontal. Os autores concluíram que a terapia probiótica pode reduzir a destruição tecidual em animais portadores de doença periodontal na ausência de estresse. O protocolo de estresse por imobilização

influenciou na resposta imuno-modulatória da terapia probiótica no tecido intestinal e periodontal.

No estudo de Garcia et al. (2015), foi avaliado, do ponto de vista histomorfométrico, os efeitos do uso local de uma espécie bacteriana probiótica (*Saccharomyces cerevisiae*) como monoterapia e adjuvante ao tratamento mecânico da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos. Setenta e dois animais foram submetidos à indução da doença periodontal pela instalação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos. Sete dias após sua instalação, a ligadura foi removida e os animais separados aleatoriamente em quatro grupos com 18 animais cada um que receberam os seguintes tratamentos: C (n=18) os animais não receberam nenhum tratamento local; RAR (n=18) os animais receberam tratamento local de Raspagem e Alisamento Radicular; PRO (n=18) os animais receberam apenas tratamento local com probiótico; RAR/PRO (n=18) os animais receberam tratamento com RAR seguido de tratamento com probiótico. Nos grupos PRO e RAR/PRO, a área da doença periodontal foi irrigada com 0,6 ml do probiótico, o equivalente à concentração de 60 milhões de bactérias, em três momentos: imediatamente, 48 e 96 horas após a remoção da ligadura. Os animais em número de 6 para cada grupo foram submetidos à eutanásia nos intervalos de 7, 15 e 30 dias. De acordo com seus resultados, no grupo RAR e RAR/PRO ocorreram similaridade dos resultados histológicos aos 7 e 15 dias. Aos 30 dias, o grupo RAR/PRO evidenciou infiltrado inflamatório com alterações qualitativas e quantitativas mais favoráveis. O grupo PRO evidenciou características de aceleração do processo de reparação tecidual em todos os períodos experimentais. Histometricamente houve menor perda óssea no grupo RAR/PRO aos 15 dias quando comparado com o grupo C. Diante dos resultados obtidos pode ser concluído que o uso do probiótico demonstrou efeitos benéficos na ausência do tratamento; foi capaz de reduzir a inflamação tecidual e a perda óssea, não demonstrando eventos histológicos indesejáveis no tratamento da periodontite experimentalmente induzida em animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp, dentro das normas vigentes adotada pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Processo FOA nº 2014-00541).

4.1 Animais

Foram utilizados 54 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 180 a 220g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 5 animais cada uma, separados de acordo com o grupo e mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração para pequenos roedores e água ad libitum.

4.2 Procedimentos experimentais

Os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico e do quimioterápico. Para todos os procedimentos experimentais os animais receberam anestesia geral, com a associação de 80 mg/kg de Cloridrato de Ketamina (Cetamim – Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda – Cotia – SP - Brasil) e 6 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Zilazin – Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda – Cotia – SP - Brasil), via intramuscular no *bíceps femoris* da pata direita. Nos casos em que não houve efeito necessário do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

4.2.1 Indução da periodontite experimental (PE)

Após anestesia geral, todos os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada que permitiu a manutenção da abertura bucal e, de forma adequada, o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma sonda e pinça modificada para este fim foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº. 24, Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar

inferior esquerdo, no nível do sulco gengival, sendo mantido nesta posição por meio de nós cirúrgicos (GARCIA et al., 2011).

4.2.2 Tratamento com 5-FU

Todos os animais receberam o quimioterápico 5-FU (Fluorouracil, 50 mg/ml – Eurofarma Laboratórios, São Paulo, Brasil) administrado por injeção intraperitoneal realizada em dois momentos: no dia da instalação da ligadura e 48 horas após. Foi utilizada a dose de 60 mg/kg de peso corporal do animal (primeira aplicação) e 40 mg/Kg de peso corporal do animal (segunda aplicação; MEDEIROS et al., 2010).

4.2.3 Grupos Experimentais

Após 7 dias da colocação da ligadura e indução da doença experimental, a mesma foi removida e a seguir, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 3 (três) grupos com 18 animais cada um, que receberam os seguintes tratamentos: Grupo 5-FU/PE: animais tratados apenas com 5-FU, sem tratamento local; Grupo 5-FU/PE/RAR: animais tratados com 5-FU e RAR e Grupo 5-FU/PE/PRO: animais tratados com 5-FU, RAR e 4 gavagens, com intervalo de 48 horas de *Lactobacillus reuteri*.

4.2.4 Tratamento com Raspagem e Alisamento Radicular

Os primeiros molares com doença periodontal dos animais dos grupos 5-FU/PE/RAR e 5-FU/PE/PRO receberam tratamento de Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) que foi realizada com cureta mini-five 1- 2 (Hu-Friede Co. Inc., Chicago, IL, EUA) com 10 movimentos disto-mesiais na superfície radicular da face vestibular e lingual, incluindo a região da furca (GARCIA et al., 2011).

4.2.5 Tratamento com Probiótico

Os animais do grupo 5-FU/PE/PRO receberam além do tratamento mecânico (RAR), o tratamento com Probiótico (*Lactobacillus reuteri*, Colikids – BioGaia, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Guarulhos, SP, Brasil- DSM 17938). O probiótico foi aplicado via sistêmica, logo após a remoção da ligadura e o tratamento com RAR. Estes animais receberam o probiótico por gavagem, sendo que esta aplicação foi mantida a cada dois dias até o 6º dia após remoção da ligadura e tratamento, totalizando 4 aplicações para cada animal. Cada aplicação teve a dose diária do probiótico recomendada pelo fabricante (0,16 mL) para o uso clínico em humanos, o equivalente a 100 milhões de bactérias, que foi depositado diretamente no tubo gástrico do animal.

4.3 Eutanásia e obtenção das amostras

Decorrido 7, 15 e 30 dias pós-tratamento, 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia pela injeção de dose letal de tiopental 150mg/kg (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil). As hemimandíbulas esquerdas foram cuidadosamente dissecadas e embebidas em solução fixadora de formaldeído à 4% tamponado (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) durante 48 horas.

4.4 Processamento histológico das amostras

Ao término do período de fixação, as hemimandíbulas esquerdas foram submetidas à lavagem em água corrente durante 24 horas e imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA), durante 30 dias. Ao término da desmineralização, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas, diafanizadas, impregnadas e incluídas em parafina, e submetidas à microtomia. Foram realizados cortes seriados com 5 µm de espessura obtidos no sentido méso-distal, com o cuidado de sempre estarem no longo eixo do dente. Os cortes histológicos foram destinados à coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

4.5 Análise histométrica

Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes eqüidistantes de cada espécime foram selecionados para análise histométrica. Esta seleção foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento efetuado (DMJM). Outro examinador calibrado e cego ao tratamento efetuado realizou a análise histométrica (OMSN). A área da perda óssea (PO) na região de furca foi histometricamente determinada utilizando um sistema de captura e análise de imagem. A PO de cada espécime foi medida três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados (ALMEIDA et al., 2008). As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa). Todo processo de análise histométrica foi realizado em microscópio de campo claro com micro-câmara acoplada para captura de imagens. Imagens da região da furca foram obtidas e armazenadas em computador.

4.6 Análise Estatística

A hipótese da PO diferir entre grupos e períodos foi testada utilizando um software (Bioestat 5.3, Manaus, AM, Brazil). A normalidade dos dados histométricos foram analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk. As análises intra e inter-grupo foram realizadas com análise da Variância (ANOVA) com nível de significância de 5%. Quando o ANOVA detectou uma diferença significativa, comparações múltiplas foram realizadas utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise histométrica

Na análise dos dados histométricos observou-se que houve menor PO nos animais do Grupo 5-FU/PE/PRO aos 7, 15 e 30 dias, quando comparados aos grupos 5-FU/PE e 5FU/PE/RAR ($P < 0,01$; Tabela 1). Não houve diferenças estatisticamente significante intra-grupo ($P > 0,05$; Tabela 1; Figuras 1 a 3).

Tabela 1 - Média $\pm$ DP dos dados histométricos da PO (mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior do lado esquerdo de acordo com grupos e períodos de avaliação.

Grupos	Períodos		
	7 dias	15 dias	30 dias
5-FU/PE	2,37 $\pm$ 0,53*	2,41 $\pm$ 0,14*	2,25 $\pm$ 0,18*
5-FU/PE/RAR	2,30 $\pm$ 0,29*	2,38 $\pm$ 0,45*	2,45 $\pm$ 0,52*
5-FU/PE/PRO	1,26 $\pm$ 0,38	0,81 $\pm$ 0,65	0,77 $\pm$ 0,33
Total	18	18	18

Fonte: Elaborado pelo Autor

* Diferença estatisticamente significante com o grupo 5-FU/PE/PRO no mesmo período (ANOVA e teste de Tukey,; $P < 0,01$).

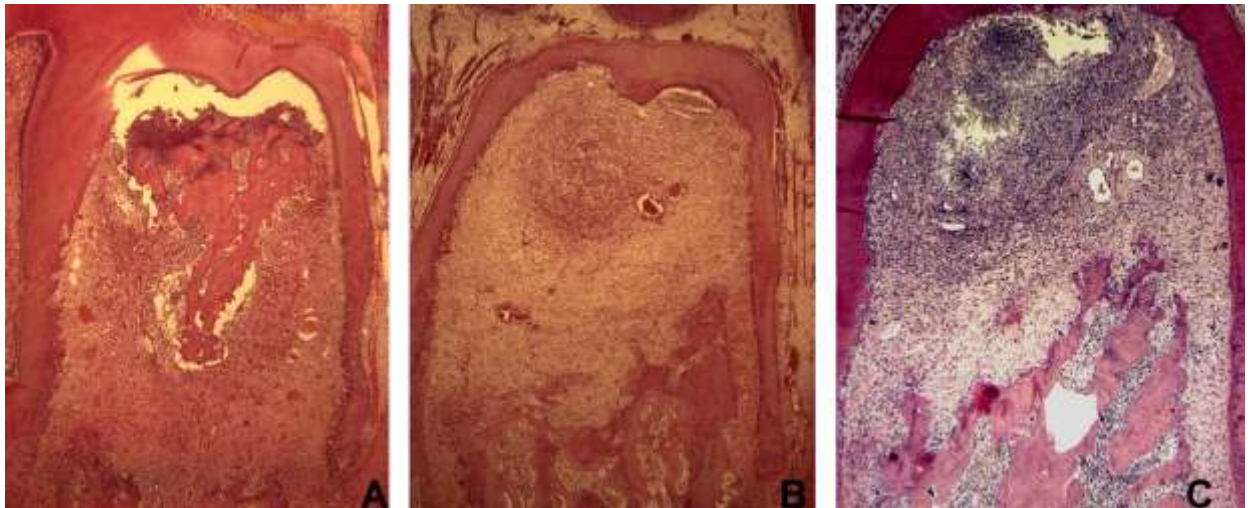


Figura 1 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos do grupo 5-FU/PE (A), 5-FU/PE/RAR (B) e 5-FU/PE/PRO (C) aos 7 dias. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 50x.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

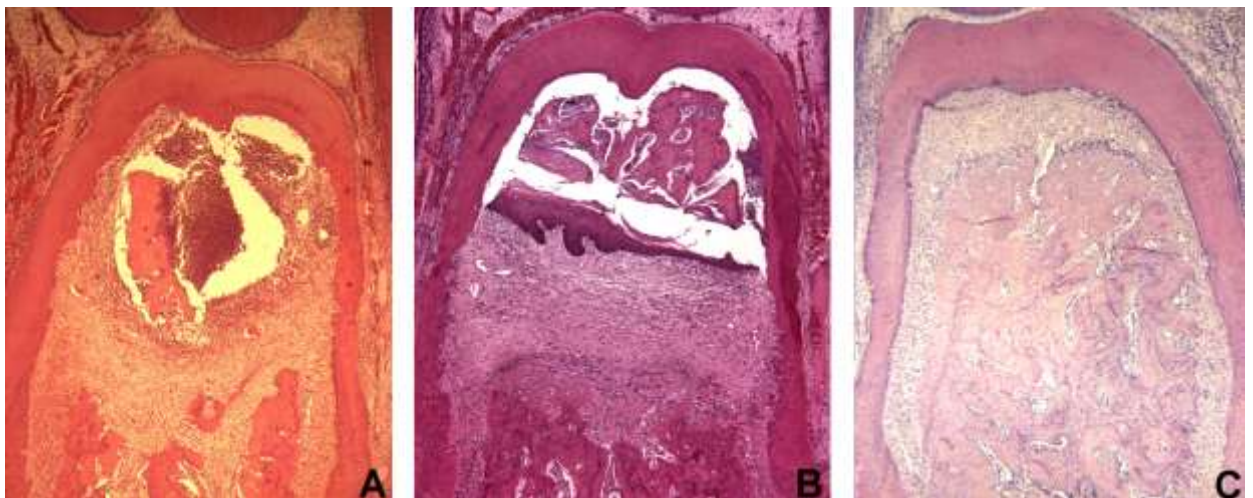


Figura 2 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos do grupo 5-FU/PE (A), 5-FU/PE/RAR (B) e 5-FU/PE/PRO (C) aos 15 dias. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 50x.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

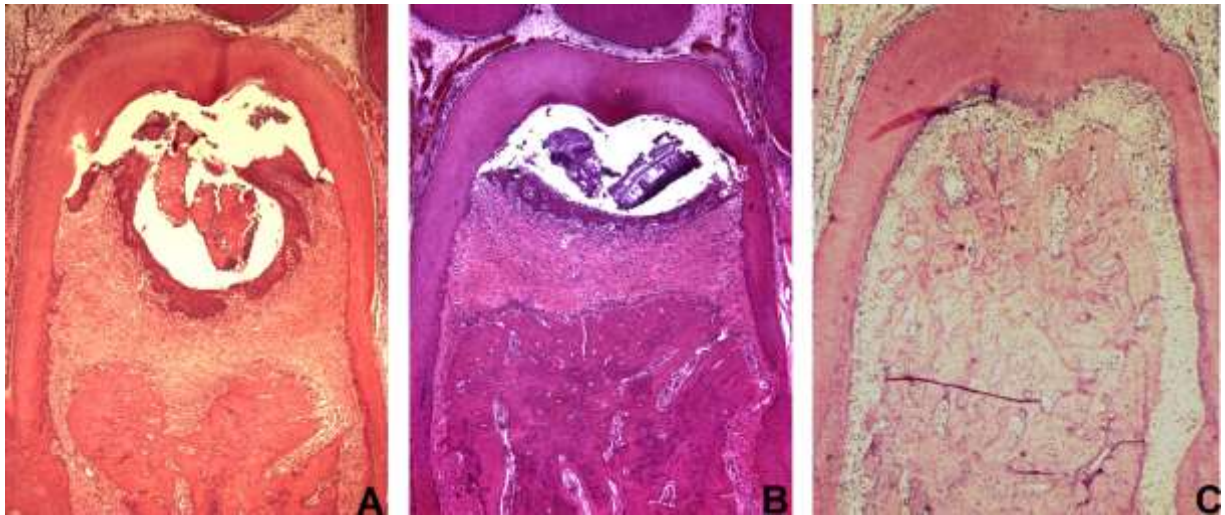


Figura 3 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos do grupo 5-FU/PE (A), 5-FU/PE/RAR (B) e 5-FU/PE/PRO (C) aos 30 dias. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 50x.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados por meio de análise histométrica, os efeitos do uso sistêmico do *Lactobacillus reuteri*, no tratamento da PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU, simulando condição clínica de pacientes portadores de doença periodontal que realizaram sessões de quimioterapia.

Diferentes modelos animais têm sido utilizados para se avaliar a progressão e o efeito de diferentes tratamentos da doença periodontal. Neste estudo optou-se pelo modelo de ratos, devido às grandes semelhanças com os humanos em relação à anatomia da região de molares, baixo custo da pesquisa e fácil manuseio (WEINBERG; BRAL, 1999). Ademais, a colocação de ligadura com fio de seda ou algodão ao redor da região cervical de primeiros molares inferiores ou superiores tem sido amplamente utilizada na indução da doença periodontal experimental (OZ; PULEO, 2011).

A PE em animais tratados com o quimioterápico 5-FU, tem se mostrado mais agressiva quando comparada a animais normais (GARCIA et al., 2015, THEODORO et al., 2016). A quimioterapia com 5-FU promove leucopenia (LIMA et al., 2005; MEDEIROS et al., 2010, GARCIA et al., 2015) sendo que a diminuição no número de neutrófilos aumenta a vulnerabilidade do hospedeiro e consequentemente a severidade da doença periodontal (NUALART et al., 2007). Em estudo de nosso grupo de pesquisa, verificou-se que a RAR não foi efetiva para o tratamento da PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU, fortalecendo a necessidade de terapias coadjuvantes em condição de imunossupressão (GARCIA et al., 2015).

O tratamento proposto com uso de probiótico coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico de RAR, têm se tornado uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de controle da doença periodontal (KODUGANTI et al., 2011), abrindo novos horizontes da sua indicação na prática clínica do tratamento periodontal principalmente quando há necessidade de uma terapia coadjuvante, comum em condições sistêmicas modificadas. Apesar do aumento do número de trabalhos avaliando a eficácia destes microrganismos, muitos estudos ainda são necessários para aumentar a evidência, de forma a suportar a sua indicação no tratamento clínico de pacientes (DHINGRA, 2012), justificando a realização de estudos preliminares em animais (OZ; PULEO, 2011). Existem evidências de que a

colonização do intestino por probióticos pode causar efeitos benéficos sistêmicos, promovendo proteção contra doenças em sítios distantes (LENOIR-WIJKNOOP et al., 2007). Dessa forma, sugere-se que as possíveis explicações para os efeitos benéficos do uso de probióticos no presente estudo incluem: prevenção da adesão de microrganismos patogênicos aos tecidos do hospedeiro ao passar pela cavidade bucal na ingestão; estímulo e modulação do sistema imune, reduzindo a produção de citocinas pró- inflamatórias e aumentando, provavelmente, a produção de citocinas anti-inflamatórias, melhora da integridade da barreira intestinal e aumento da produção de mucinas; eliminação ou inibição do crescimento de patógenos pela produção de bacteriocinas ou outros produtos, como ácidos e peróxidos (KODUGANTI et al., 2011) e diminuição do pH luminal (CORR; GAHAN; HILL, 2006; SHIUMACHI et al., 2008).

Dentre os probióticos das espécies de lactobacilos, o *Lactobacillus reuteri* chama a atenção devido à sua capacidade de permitir a formação de reuterina, substância capaz de desempenhar um papel importante na manutenção de uma flora microbiana saudável, pois impede o crescimento de outros microorganismos patogênicos (JONES; VERSALOVIC, 2009). Nenhum trabalho na literatura avaliou a influência do *Lactobacillus reuteri* na PE. Porém, ensaios clínicos recentes, tem demonstrado a possibilidade de sua aplicação como adjuvante à terapia periodontal não cirúrgica. Estes estudos permitiram concluir que *Lactobacillus reuteri* inibe a formação da placa, possui ação anti-inflamatória e ação antimicrobiana, sendo capaz de diminuir significativamente a quantidade de *Porphyromonas gingivalis* na placa subgengival, além de promover a redução significativa da resposta de citocina pró-inflamatória, permitindo assim a melhoria dos parâmetros clínicos periodontais (VIVEKANANDA et al., 2010, INIESTA et al., 2012, SZKARADKIEWICZ et al., 2014, INCE et al., 2015).

No presente estudo demonstrou-se o efeito benéfico do uso sistêmico do *Lactobacillus reuteri* como terapia coadjuvante no controle da perda óssea causada por doença periodontal induzida por ligadura em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU em todos os períodos de avaliação, além disso, foi comprovado que através da administração sistêmica do *Lactobacillus reuteri*, é possível obter uma menor perda óssea na área de furca pela quimioterapia com 5-FU. Este resultado está de acordo com estudos onde a PE foi induzida em animais saudáveis e os animais

foram tratados com probióticos locais ou sistêmicos (FOUREAUXET et al., 2013, MESSORA et al., 2013, GARCIA et al., 2015, MESSORA et al., 2016).

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do estudo conclui-se que a terapia sistêmica com *Lactobacillus reuteri*, como coadjuvante à RAR é efetiva no tratamento da PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

REFERÊNCIAS

Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1998;59: 222-30.

Aimetti M, Romano F, Guzzi N, Carnevale G. Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):284-94.

Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oschiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol.* 2008;79:1081-8.

Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent.* 2007;18:34-8.

Apatzidou DA, Kinane DF. Nonsurgical mechanical treatment strategies for periodontal disease. *Dent Clin North Am.* 2010;54(1):1-12.

Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules.* 2008;13(10):2340-69.

Barton D. Oral agents in cancer treatment: the context for adherence. *Semin Oncol Nurs.* 2011; 27(2):104-15.

Buddula A, Assad DA, Salinas TJ, Garces YI, Volz JE, Weaver AL. Survival of dental implants in irradiated head and neck cancer patients: a retrospective analysis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(5):716-22.

Bültzingslöwen I, Jontell M. Macrophages, dendritic cells and lymphocytes in rat buccal mucosa and dental pulp following 5-fluorouracil treatment. *Eur J Oral Sci.* 1999;107:194-201.

- Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR. The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics. *Oral Diseases*. 2005;11(1):29-31.
- Chang PC, Chung MC, Wang YP, Chien LY, Lim JC, Liang K, Chong LY, Kuo YP, Chen CH, Chiang HC. Patterns of diabetic periodontal wound repair: a study using micro-computed tomography and immunohistochemistry. *J Periodontol*. 2012;83:644-52.
- Claffey N, Polyzois I. Terapia não-cirúrgica. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 5nd ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2008.
- Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79:1569-76.
- Corr SC, Gahan GMC, Hil, C. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune: response. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;50(3):380-88.
- De Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, Prebiotics and Symbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2008;111:1-66.
- Dhingra, K. Methodological issues in randomized trials assessing probiotics for periodontal treatment. *J Periodontal Res*. 2012;47(1):15-26.
- Dreizen S. Stomatotoxic manifestations of cancer chemotherapy. *J Prosthet Dent*. 1978;40:650-5.
- Epstein JB, Tsang AH, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod*. 2002;94:39-44.

Foureaux RC, Messoria MR, De Oliveira LF *et al.* Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *J Periodontol.* 2014;85:975-83.

Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, De Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, Nagata MJH, Cirelli JA, Theodoro LH. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011;38:1106–14.

Garcia VG, Knoll LR, Longo M, Novaes VCN, Assem NZ, Ervolino E, DE Toledo BE, Theodoro LH. Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2015;51(1):26-37.

Garcia VG, Novaes VC, De Almeida JM, Longo M, Ervolino E, Bomfim SR, Theodoro LH. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer Jul.* 2015;23(7):2007-17.

Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010;89:1349-63.

Granström G. Craniofacial osseointegration. *Oral Dis.* 2007;13(3):261-9.

Granström G. Osseointegration in irradiated cancer patients: an analysis with respect to implant failures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(5):579-85.

Guimarães MR, Coimbra LS, De Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodont Res.* 2011;46(2):269–79.

Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.

Hatakka K, Ahola AJ, YLI-Knnttilla H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, Korpela R. Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly – A randomized controlled trial. *J Dent Res*. 2007;86:125-30.

Ijiric K, Potten CS. Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchichal status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation. *Br J Cancer*. 1983;47:175-85.

İnce G, Gürsoy H, İpçi ŞD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yilmaz S. Clinical and biochemical evaluation of lozenges containing *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2015;86(6):746-54.

Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbiggen M, Matos AR, Marin MJ, Sanchez-Beltran MC, Llama-Palacio A, Sanz M. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012;39:736-44.

Javed F, Ai-Askar M, Ai-Rasheed A, Babay N, Galindo-Moreno P, Al-Hezaimi K. Comparison of sel-perceived oral health periodontal inflammatory conditions and socioeconomic status in individuals with and without prediabetes. *Am J Med Sci*. 2012;344:100-4.

Javed F, Almas K. Osseointegration of dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment: a literature review. *J Periodontol*. 2010;81:479-84.

Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer*. 2003;11:207-25.

Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol*. 1993;64:243-53.

Keestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic

periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2015;50(3):294-314.

Kiss E, Sewon L, Gorzó I, Nagy K. Salivary calcium concentration in relation to periodontal health of female tobacco smokers- a pilot study. *Quintessence Int.* 2010;41(9):779-85.

Koduganti RR, Sandeep N, Goduguntla S, Chandana Gorthi VS. Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. *Indian Journal of Dental Research.* 2011;22(2):324-30.

Kovács AF. Influence of chemotherapy on endosteal implant survival and success in oral cancer patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(2):144-7.

Krasse P, Carlssona B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J.* 2006;30:55-60.

Lenoir-Wijnkoop, I. et al. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Reviews.* 2007; 65(11): 469-89.

Lima V, Brito GA, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BA, Augusto RF, Souza ML, Leitão BT, Ribeiro RA. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(3):210-7.

Lopes NN, Plapler H, Chavantes MC, Lalla RV, Yosshimura EM, Alves MT. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols. *Support Care Cancer.* 2009;17(11):1409-15.

Lopes NN, Plapler H, Chavantes MC, Lalla RV, Yosshimura EM, Alves MT. Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Laser Surg Med.* 2010;42(6):546-552.

Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodont Res.* 2014;49:785–91.

Matia JI, Bissada NF, Maybury JE, Ricchetti P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1986;6:24-35.

Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Himura H, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, Shimauchi H. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets, placebo controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36:506-13.

Mazzeo MA, Linares JA, Campos ML, Busamia BE, Dubersarsky C *et al.* Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Med Oral Patol Cir Bucal.* 2009;1:108-13.

Medeiros CACX, Leitão RFC, Macedo RN, Barbosa DRMM, Gomes AS, Nogueira NAP, Alencar NMN, Ribeiro RA, Brito GAC. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;67(5):1085-100.

Messora MR, Pereira LJ, Foureaux R, Oliveira LFF, Sordi C G, Alves AJN, Napimoga M, Nagata MJH, Ervolino E, Furlaneto FAC . Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2016;66:108-19.

Messora MR, Oliveira LF, Foureaux RC *et al.* Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol.* 2013;84:1818-26.

Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis.* 2007;13(5):443-51.

Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Sumam A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis — complicating the treatment of cancer. *Neoplasia.* 2004;6:423–31.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S *et al.* Protein expression and functional difference of membranebound and soluble receptor activator of NF-Kappa B ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *BiochemBiophys Res Commun.* 2000;275:768-75.

Noordhuis P, Holwerda U, Van Der Wilt CL, Van Groenigen CJ *et al.* 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol.* 2004;15:1025-32.

Nualart Grollmus ZC, Morales Chávez MC, Silvestre Donat FJ. Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(3):211–5.

Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:754857.

Paul GT, Hemalata M, Faizuddin M. Modified widman flap and non-surgical therapy using chlorhexidine chip in the treatment of moderate to deep periodontal pockets: a comparative study. *J Indian Soc Periodontol.* 2010;14(4):252-6.

Peterson, LJ, Ellis III, E, Hupp JR., Tucker, MR. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea.* 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 880p.

Pritchard DM, Potten CS, Korsmeyer SR, Roberts S, Hickman JA. Damage-induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. *Oncogene*. 1999;18:7187-93.

Puupponen-Pimiä R, Aura AM, Oksman-Caldentey KM, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sanholm T, Poutanen K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci Technol*. 2002;13:3-11.

Ramfjord SP, Knowles JW, Nissle RR, Burgett FG, Shick RA. Results following three modalities of periodontal therapy. *J Periodontol*. 1975;46(9):522-6.

Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000*. 1996;10:139-59.

Ribeiro FV, De Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011;82(8):1187-96.

Rodrigues AS, Lourenção DS, Lima Neto LG, Pannuti CM, Crespo Hirata RD, Hirata MH, Lotufo RF, De Micheli G. Clinical and microbiologic evaluation, by real-time polymerase chain reaction of non-surgical treatment of aggressive periodontitis associated with amoxicillin and metronidazole. *J Periodontol*. 2012;83(6):744-52.

Sacono NT, Costa CAS, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FCB. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Laser in Surgery and Med*. 2008;40:625-33.

Scully C, Sonis S, Diz PD. Oral mucositis. *Oral Dis*. 2006;12:229-41.

- Serino G. Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001;28(10):910-6.
- Shimauchi H, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008;35(10):897-905.
- Slots J, Rams TE. New views on periodontal microbiota in special patient categories. *J Clin Periodontol.* 1991;18:411-20.
- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992;63:322-31.
- Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauerjensen M *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer.* 2004;100:1995-2025.
- Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology2000.* 2001;55:143-66.
- Souza AB, Chambrone L, Okawa RTP, Oliveira e Silva C, Araújo MG. A obesidade como fator de risco para doença periodontal: revisão de literatura. *Rev Dental Press Periodontia Implantol.* 2010;4(4):34-43.
- Staab B, Eick S, Knofler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2009;36:850-6.
- Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic *Lactobacilli* and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Res.* 2009;43:374-81.

Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobcillus* against oral pathogens. *Lett App Microbiol*. 2011;53:452-9.

Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011;38:159-77.

Teughels W, Newman MG, Coucke W, Hafajee AD, Van Der Mei HC, Haake SK. Guiding periodontal pockets recolonization: a proof of concept. *J Dent Res*. 2007;86:1078-82.

Theodoro LH, Ervolino E, Duque C, Ferro-Alves ML, Zanini NA, Louzada LM, Garcia VG. Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. *J Periodontal Res*. 2016. No prelo. doi: 10.1111/jre.12347.

Tong D, Poot M, Hu D, Oda D. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. *Oral Oncol* 2000;36:236-41.

Tsubara S, Mizunuma H, Ishikawa S, Oyake I, Okabayashi M, Katob K, Shibata M, Lizuka T, Toda T. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:1353-6.

Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol*. 2010;2:1-9.

Von Bultzingslowen I, Jontell M, Hurst P, Nannmark U, Kardos T. 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. *Oral Oncol*. 2011;37:537-44.

Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol*. 1999;26(6):335-40.

Wolff L, Dahlen G, Aepli D. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol.* 1994;65:498-510.

Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, Van Der Weijden FA. The clinical effect of scaling and root planning and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *J Periodontol.* 2012;21:1-29.

Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngologic clinics of North Am.* 1993;26:1069-89.

Zijnge V, Meijer HF, Lie MA, Tromp JAH, Degener JE, Harmsen HJM, Abbas F. The recolonization hypothesis in a full-mouth or multiple-session treatment protocol: a blinded, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2010;37(6):518-25.

Zuza EP, Barroso EM, Carrareto ALV, Pires JR, Carlos IZ, Theodoro LH, Toledo BEC. The role of obesity as a modifying factor in patients undergoing non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol.* 2011;82:676-82.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



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 "Efeitos do uso de probiótico administrado localmente ou sistemicamente coadjuvante à terapia periodontal mecânica, no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em animais sistemicamente normais ou imunossuprimidos com quimioterápico (5-FU): estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em ratos", Processo FOA nº 2014-00541, sob responsabilidade de Valdir Gouveia Garcia apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de junho de 2014.

VALIDADE DESTA CERTIFICADO: 28 de Fevereiro de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Março de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Use local or systemic probiotic in mechanical therapy at periodontal disease in normal or immunosuppressed animals by chemiotherapeutic (5-FU): histomorphometric and immunoistochemical study in rats", Protocol FOA nº 2014-00541, under the supervision of Valdir Gouveia Garcia presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 28, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 28, 2017.

Prof. Dr. Antônio Arvalino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua João Bonifácio, 1193 - Via Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 - Email CEUA: ceua@foc.unesp.br