



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Thayane Cerquiare Businari

**Efeito do quimioterápico 5-FU na imunolocalização
do antígeno nuclear de proliferação celular em
tecido gengival de áreas com doença periodontal
induzida.**

ARAÇATUBA-SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Thayane Cerquiare Businari

**Efeito do quimioterápico 5-FU na imunolocalização
do antígeno nuclear de proliferação celular em
tecido gengival de áreas com doença periodontal
induzida.**

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 a
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Ass. Dr.^a Letícia
Helena Theodoro.

ARAÇATUBA-SP

2016

Dedicatória

Aos meus pais, Adilson Reinaldo e Maria Cecília, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu pudesse estar realizando meu sonho, inclusive se abdicaram dos seus para isso. Vocês são a minha base, meu porto seguro e se hoje estou me formando é graças a vocês. Tivemos muitas dificuldades ao longo desses anos de minha formação, mas juntos e com fé em Deus conseguimos supera-las. Muito obrigada, se eu for para os meus filhos metade do que vocês são pra mim, serei muito feliz. A vocês dedico e agradeço por mais essa etapa em minha vida.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço á Deus sempre presente na minha vida, esperança e motivo a quem devo a realização de todos os meus objetivos.

Ao meu Namorado, Douglas, por sempre estar presente em minha vida, pelo carinho e paciência comigo. Por ser meu companheiro e força.

Aos meus irmãos Maison e Allison, por serem apoio e amparo em minha vida.

Aos meus pais, meus avós, meus sogros, minhas cunhadas e família que sempre acreditaram em mim e me apoiaram.

À Carolina Cardoso, aquela irmã que a faculdade me deu, amiga e companheira de todos os momentos, e por sempre me dar apoio e força quando precisei.

As amigas, Betina, Bruna, Lara, Letícia, Luara e Mariana, pelas alegrias compartilhadas durante a graduação e serem aquelas presentes no meu dia a dia, sentirei muita falta.

Aos pós-graduandos da Periodontia: Naida Assem, Mariellen Longo, Marcio Ferro, Marina Módolo, Daniela Maria J.Miessi, Marta Nuernberg, que muito contribuíram para minha formação acadêmica e também minha formação pessoal.

Ao Prof. Edilson Ervolino, que contribuiu grandemente na execução desse trabalho e em minha vida acadêmica.

Ao Prof. Wilson Poi, que foi um grande amigo durante a minha graduação, o terei com muito carinho em minhas lembranças, bem como seus sábios conselhos e apoio.

À Profa. Letícia Theodoro, pelo carinho me passado durante nossa convivência, pelos conhecimentos durante minha formação acadêmica, pela oportunidade de tê-la como minha orientadora, pelo apoio, atenção e dedicação durante o período de desenvolvimento da minha iniciação científica, deste trabalho, e também pela oportunidade de fazer parte de seu projeto de extensão exemplar, humanitário e didático.

Aos meus professores, que me engrandeceram com seus ensinamentos e exemplos.

Aos funcionários da FOA, que sempre nos ajudaram e contribuíram para nossa formação.

À minha amada e respeitada Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Foa-Araçatuba. Sou muito feliz e orgulhosa de fazer parte dessa equipe.

Agradeço à **Reitoria da UNESP e ao CNPq** pela concessão de bolsa de iniciação científica (PIBIC- Processo118770/2014-4) e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pelo auxílio para desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2012/08649-3)

Que a gratidão de vocês seja o sacrifício que oferecem a Deus, e que vocês deem ao Deus Altíssimo tudo aquilo que prometeram!

Salmos 50:14

“Você sabe que chegou ao ápice quando: fez amizades no passado, está concentrado no presente e é otimista em relação ao futuro”

Businari TC. Efeito do quimioterápico 5-FU na imunolocalização do antígeno nuclear de proliferação celular em tecido gengival de áreas com doença periodontal induzida. - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

A periodontite é uma condição patológica multifatorial que envolve a presença de microrganismos periodontopatogênicos e a resposta imune inflamatória local de um hospedeiro susceptível. No entanto, sob um regime quimioterápico a microbiota oral e a resposta do hospedeiro são profundamente alteradas. Além disso, agentes antineoplásicos, como o 5 Fluorouracil (5-FU), comprometem a integridade estrutural de tecidos com alto índice de proliferação, como é o caso do epitélio juncional, a primeira barreira de proteção dos tecidos periodontais. A maneira pela qual os agentes antineoplásicos influenciam a progressão e o tratamento da periodontite é pouco explorada e conseqüentemente muito pouco compreendida. Estudo de nosso grupo de pesquisa demonstrou que o 5-FU agrava a progressão da periodontite, mas não afeta os tecidos na ausência da doença. Sendo assim, há a necessidade da realização de estudos que avaliem o efeito do 5-FU sobre a proliferação celular do tecido gengival de áreas com doença periodontal, o que poderia justificar o agravamento da periodontite já que o epitélio é a primeira barreira de defesa do hospedeiro contra agressores da placa bacteriana. O objetivo deste estudo foi de Avaliar o efeito do 5-Fluorouracil sobre a proliferação celular via imunomarcagem do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em tecido gengival de áreas com periodontite experimental (PE) em ratos. A PE foi induzida por meio de ligadura, mantida por 7 dias, nos primeiros molares inferiores esquerdos em 48 ratos. Os animais foram separados em: Grupo PE (n=24) - não receberam nenhum tratamento, além de injeção de solução salina; e Grupo 5-FU/PE (n=24) - receberam tratamento sistêmico com 5-FU. Os animais do grupo 5-FU/PE receberam o quimioterápico 5-FU administrado por injeção intraperitoneal realizada no dia da instalação da ligadura (60 mg/kg) e 48 horas (40 mg/kg) após, enquanto os animais do grupo PE receberam injeção de solução salina nos mesmos momentos. Oito animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após a remoção da

ligadura. Foram realizados processamento e análise imunoistoquímica para imunolocalização de células PCNA positivas. A análise quantitativa do tecido conjuntivo e tecido epitelial foi efetuada em duas áreas da região interproximal e os dados obtidos de cada grupo foram avaliados estatisticamente, com nível de significância de 5% em cada período de avaliação (Teste t de student). Observou-se maior imunomarcção de PCNA no Grupo 5-FU/PE no período de 7 dias ($p < 0,01$), e no Grupo PE nos períodos de 15 ($p < 0,01$) e 30 dias ($p < 0,05$) nas áreas de tecido conjuntivo. No grupo 5-FU/PE foi observada menor imunomarcção de PCNA no tecido epitelial, no período de 30 dias ($p < 0,05$) quando comparado aos animais que não foram expostos a quimioterapia. Conclui-se que o 5-FU tem um efeito negativo na proliferação celular tanto no tecido conjuntivo como no tecido epitelial atrasando o processo de reparação e comprometendo a integridade estrutural dos tecidos de áreas com periodontite experimental em ratos.

Palavras-chaves: Periodontite. Ratos. Quimioterápico.

Businari TC. 5-FU chemotherapeutic effect in immunolocalization of the nuclear antigen of cellular proliferation in gingival tissue areas with induced periodontal disease-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Periodontitis is a multifactorial pathological condition that involves the presence of microorganisms periodontopathogenic inflammatory immune response and location of a susceptible host. However, under a chemotherapy regimen oral microbiota and the answer the host are profoundly changed. Moreover, antineoplastic agents such as 5 fluorouracil (5-FU), compromise the structural integrity of tissues with a high proliferation index, as is the case of the junctional epithelium, tissue of the first protective barrier periodontitis. The manner in which antineoplastic agents influencing progression of periodontitis and the treatment is underexplored and consequently poorly understood. Study our research group demonstrated that 5-FU aggravates the progression of periodontitis, but does not affect the tissues in the absence of disease. Thus, there is a need for studies that evaluate the effect of 5-FU on the proliferation Cell gingival tissue areas with periodontal disease, which could justify the increase of periodontitis since the epithelium is the first line of defense of the host against the attackers plaque. The objective was to evaluate the effect of 5-fluorouracil on cell proliferation via immunostaining of proliferating nuclear antigen cell(PCNA) in gingival tissue areas with experimental periodontitis (EP) in rats. The PE was induced by ligation, maintained for 7 days, the first left molars in 48 rats. The animals were divided into: Group EP (n = 24) - received no treatment, and saline injection; and Group 5-FU/EP (n = 24) - received systemic treatment with 5-FU. Animals in group 5-FU/PE received 5-FU chemotherapy administered by intraperitoneal injection performed on the ligation of the installation (60 mg / kg) and 48 hours (40 mg / kg) after, while the animals of Group PE received saline injection at the same moments. Eight animals in each group were euthanized at 7, 15 and 30 days after removal of the ligature. We performed immunohistochemical processing and analysis for immunolocalization of PCNA positive cells. Quantitative analysis the connective tissue and epithelial tissue was carried out in two areas of the

interproximal area and the data obtained from each group were statistically evaluated with 5% significance level in each evaluation period (t test student). There was greater PCNA immunostaining in Group 5-FU/EP during the period of 7 days ($p < 0.01$) in Group EP and at 15 ($p < 0.01$) and 30 days ($p < 0.05$) in the areas connective tissue. Group 5-FU/EP was observed in the lower immunoblot PCNA epithelial tissue in the 30-day period ($p < 0.05$) when compared to animals that were not exposed to chemotherapy. It is concluded that 5-FU has a negative effect on cell proliferation both in the connective tissue and epithelial tissue in slowing the repair process and compromising the structural integrity of areas of tissue with experimental periodontitis in rats.

KEYWORDS: *Periodontitis. Rats. Chemotherapy*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 e 2	Fotomicrografia demonstrando a delimitação das células PCNA positivas no tecido epitelial e conjuntivo na região interproximal do primeiro molar inferior esquerdo. Aumento original 100x	21
Figura 3 e 4	Gráfico demonstrando a média da contagem de células PCNA positivas no tecido epitelial e conjuntivo em cada grupo e período de avaliação	23
Figura 5	Fotomicrografia da região interproximal dos molares inferiores esquerdos do grupo PE (A) e grupo 5-FU/PE (B) aos 7 dias. Coloração Fast Green. Aumento original 100x.	24
Figura 6	Fotomicrografia da região interproximal dos molares inferiores esquerdos do grupo PE (A) e grupo 5-FU/PE (B) aos 15 dias. Coloração Fast Green. Aumento original 100x.	24
Figura 7	Fotomicrografia da região interproximal dos molares inferiores esquerdos do grupo PE (A) e grupo 5-FU/PE (B) aos 30 dias. Coloração Fast Green. Aumento original 100x.	25
Anexo I	Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia - Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba e aprovado dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo nº00800-2012).	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	= Doença Periodontal
ETDA	= Ácido Etilenodiaminotetracético
PCNA	= Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PE	= Periodontite experimental
RAR	= Raspagem e Alisamento Radicular
5-FU	= 5-Fluorouracil

SUMÁRIO

1.	Introdução	14
2.	Objetivo	17
3.	Materiais e Método	18
3.1.	Animais	18
3.2.	Indução da periodontite experimental	18
3.3.	Tratamento com 5-FU (droga quimioterápica)	19
3.4.	Grupos experimentais	19
3.5.	Períodos experimentais	19
3.6.	Processamento biológico e imunoistoquímico	19
3.7.	Análise imunoistoquímica	20
3.8.	Análise estatística	20
4.	Resultados	22
4.1.	Análise imunoistoquímica	22
5.	Discussão	26
6.	Conclusão	31
	Referências	32
	Anexo	36

1-Introdução

A periodontite é uma condição patológica multifatorial que envolve a presença de espécies bacterianas específicas e a resposta inflamatória local imunitária de um hospedeiro susceptível (DARVEAU, 2009). Algumas espécies bacterianas são considerados periodontopatogênicas, incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivallis* (VANHOECKE et al., 2014). No entanto, sob um regime quimioterápico a microbiota oral e a resposta do hospedeiro são profundamente alteradas (ARIAS et al., 2008).

Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) haverá 600 mil novos casos de Neoplasias malignas no território nacional no biênio de 2016-2017, dentre esses nos homens 61 mil novos casos de tumores de próstata e nas mulheres 58 mil novos casos de tumores de mama, sendo os tumores sólidos mais frequentes. Os tumores da cabeça e do pescoço representam o quinto câncer mais frequente no mundo, sendo que só no Brasil as estimativas para 2016 são de 15.490 novos casos (INCA, 2016).

Radioterapia, quimioterapia ou a associação entre tais métodos são frequentemente utilizados no tratamento oncológico, essas abordagens levam a diversas modificações na cavidade oral, aumentando o risco de doença periodontal e alterando o processo de cura destes pacientes (DJURIC et al., 2010).

A quimioterapia baseia-se na administração sistêmica de fármacos dirigidos contra certos grupos moleculares, 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 da cavidade bucal (PETERSON et al., 2005).

Estudos clínicos em humanos demonstraram que a quimioterapia provoca aumento do índice de placa, do índice de sangramento (DJURIC et al., 2010), do índice gengival

(JENSEN et al., 2008; DJURIC et al., 2010) e da profundidade de sondagem (MAZZEO et al., 2009; DJURIC et al., 2010). No entanto, a maneira pela qual os agentes antineoplásicos influenciam a progressão e o tratamento da periodontite é pouco explorada e consequentemente muito pouco compreendida.

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 do mais, enfraquecem o sistema imunológico do paciente, impedindo a fase inflamatória das feridas e consequentemente aumentando a possibilidade de infecção (GUO et al., 2010).

Os fármacos quimioterapêuticos mais frequentemente administrados são: 5-Fluororacil (5-FU), cisplatina, metotrexato, bleomicina e vincristina (GRANSTRÖM, 2007). O 5-FU é o fármaco mais associado à mucosite, durante a quimioterapia, pois é um análogo que interfere na síntese de DNA, provocando a destruição de células que se desenvolvem rapidamente (GARG e GUEZ, 2011). Entre os agentes antineoplásicos o 5-FU é amplamente usado no tratamento dos tumores do trato gastrointestinal, fígado, cérebro, mama e ovário (THEODORO et al., 2016).

Atualmente os modelos de periodontite experimental em animais tem contribuído muito para elucidar o mecanismo pelo qual drogas ou determinadas condições sistêmicas afetam a progressão e o tratamento da periodontite (FERNANDES et al., 2009; GARCIA et al., 2011; GARCIA et al., 2013). Todavia, poucos estudos experimentais em animais exploraram o impacto do quimioterápico 5-FU sobre a periodontite (GARCIA et al., 2015). A condição periodontal de pacientes submetidos a quimioterapia não é geralmente considerado como importante (DJURIC et al., 2010). Mas, como a maioria da população adulta sofre de doença periodontal, deve ser mantido em mente que bolsas periodontais podem ser um

reservatório de infecção e uma fonte potencial para disseminação sistêmica de infecção bacteriana (DJURIC et al., 2010). Estudos recentes de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o 5-FU agrava a progressão da periodontite (THEODORO et al., 2016, GARCIA et al., 2015) mas não afeta os tecidos periodontais na ausência da doença (GARCIA et al., 2015).

2-Objetivo

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do 5-Fluorouracil sobre a proliferação celular via imunomarcção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em tecido gengival de áreas com periodontite experimental em ratos.

3-Materiais e Métodos

3.1 Animais

Este estudo foi realizado em 48 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com idade entre 3 a 4 meses, pesando entre 180-250 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). O protocolo experimental foi aprovado pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (no. 00800-2012).

3.2 Indução da Periodontite Experimental

Para todos os procedimentos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular da associação de 70 mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – EUA) e 6 mg/kg de cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil). A periodontite foi induzida por meio da instalação de um fio de algodão (Corrente Algodão n°.24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior do lado esquerdo de cada animal. A ligadura foi mantida durante 7 dias em posição subgengival por meio de nós cirúrgicos.

3.3 Tratamento com 5-FU (droga quimioterápica)

O tratamento sistêmico consistiu na injeção intraperitoneal de 60mg/kg e 40 mg/kg de 5-FU (5-Fluorouracil; 50 mg/ml; Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) no dia da instalação da ligadura e 48 horas após, respectivamente.

3.4 Grupos Experimentais

Após 7 dias da sua instalação a ligadura foi removida e os animais foram separados aleatoriamente, seguindo uma tabela gerada em computador, em grupos de acordo com os seguintes tratamentos locais realizados no primeiro molar inferior esquerdo:

PE (n=24) - nenhum tratamento local e tratados sistemicamente com injeção de solução salina; 5FU/PE (n=24) – tratados sistemicamente com 5-FU, sem tratamento local.

3.5 Períodos experimentais

Oito animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia pela injeção de dose letal de tiopental 150 mg/kg (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos locais da PE. As hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas e fixadas em formaldeído 4% em solução tamponada de 0,1 M, durante 48 horas, para realização das análises imunoistoquímicas.

3.6 Processamento histológico e imunoistoquímico

Os espécimes foram desmineralizados em ácido etilenoaminotetracético (EDTA) a 10% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Cortes semi seriados (4 µm) foram obtidos no sentido mésio distal. Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de interproximal foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram obtidos e seis cortes foram submetidos à técnica imunoistoquímica. Esta seleção foi realizada por um examinador experiente, treinado e cego aos tratamentos efetuados (TCB). Foi utilizada a técnica de imunoperoxidase indireta empregando-se o seguinte anticorpo primário: anti-PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) (VP-P980, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). O processamento imunoistoquímico seguiu o protocolo descrito por Garcia et al. (2013)

3.7 Análise Imunoistoquímica

Um examinador treinado e cego aos tratamentos (TCB) selecionou uma secção histológica do biomarcador (PCNA) de cada espécime. Um histologista certificado (EE) e cego aos tratamentos realizou as análises imunoistoquímicas. A imunomarcção foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citosólico das células positivas. Foi realizada a delimitação do tecido epitelial e tecido conjuntivo, calculando a área e se fazendo uma contagem do número de células por mm². A imunomarcção para PCNA foi realizada pela contagem de células PCNA-positivas localizadas no tecido epitelial e tecido conjuntivo de uma área da região interproximal do primeiro molar inferior esquerdo, com um aumento de 10x em três cortes histológicos equidistante. O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar. (Figuras 1 e 2).

3.8 Análise Estatística

Os dados foram tabulados apropriadamente, e submetidos a análise estatística com o software BioEstat 5.0, onde se verificou a normalidade dos dados pelo teste de Lilliefors, constatada a normalidade dos dados os mesmo foram submetidos a Análise de Variância seguida pelo teste Tukey, com nível de significância de 5%.

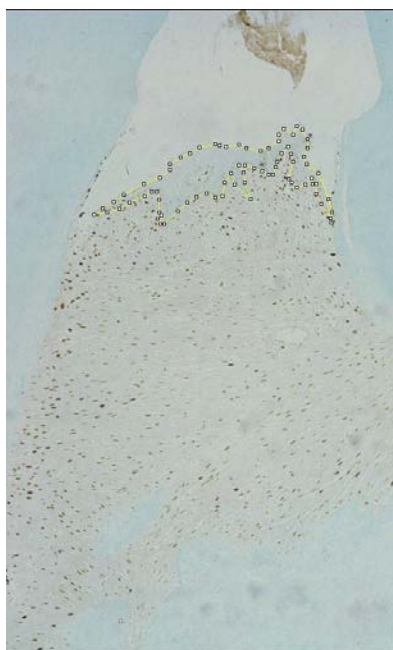


Figura 1. Fotomicrografia demonstrando a delimitação das células PCNA positivas no tecido epitelial a região interproximal do primeiro molar inferior esquerdo. Aumento original 100x.

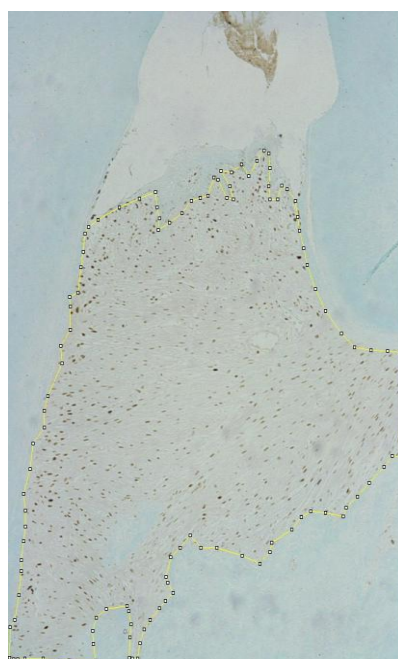


Figura 2. Fotomicrografia demonstrando a delimitação das células PCNA positivas no tecido conjuntivo da região interproximal do primeiro molar inferior esquerdo. Aumento original 100x

4-Resultados

4.1 Análise imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de PCNA mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica. As células imunorreativas apresentaram uma coloração acastanhada confinada ao compartimento citossólico. A imunomarcação para PCNA foi expressa predominantemente em células positivas na região interproximal.

Os dados quantitativos das células PCNA- positivas estão apresentados nas figuras 3 e 4. Aos 30 dias os animais do grupo 5-FU/PE apresentaram menor imunomarcação de células PCNA positivas no tecido epitelial, quando comparado ao grupo PE ($p<0,05$). No tecido conjuntivo houve maior imunomarcação de células PCNA positivas no grupo 5-FU/PE aos 7 dias quando comparado ao grupo PE. Na análise intra-grupo do tecido conjuntivo e tecido epitelial houve uma maior imunomarcação no grupo PE aos 15 e 30 dias quando comparado aos 7 dias (Figuras 5, 6 e 7).

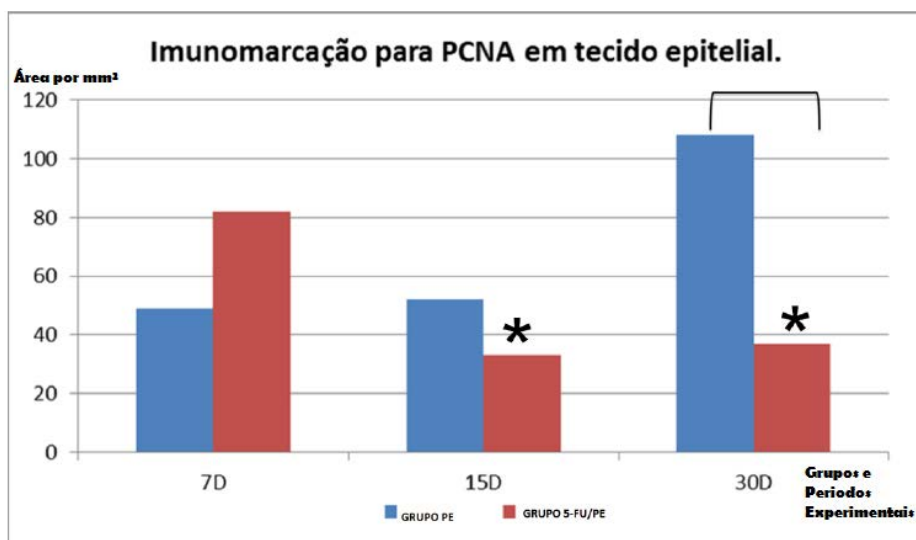


Figura 3. Gráfico demonstrando a média da contagem de células PCNA positivas no tecido epitelial em cada grupo e período de avaliação.

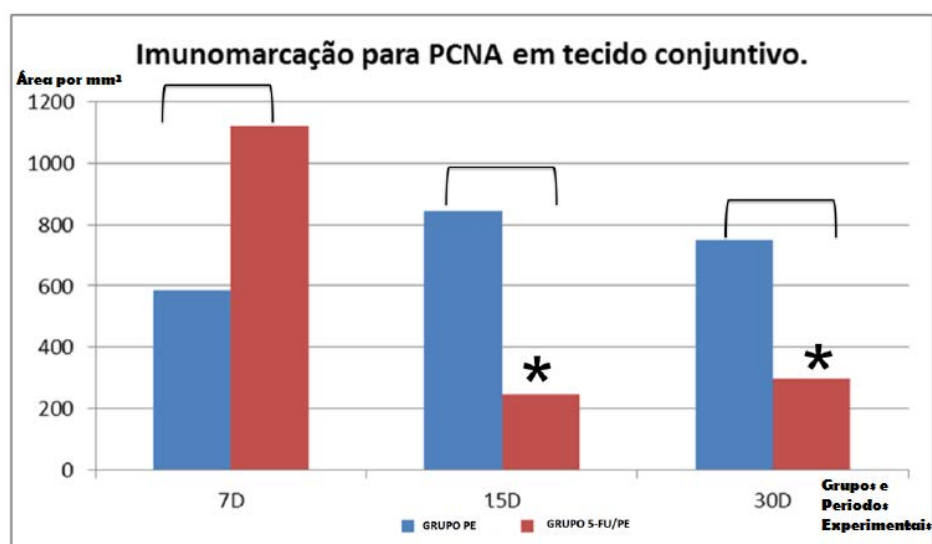


Figura 4. Gráfico demonstrando a média da contagem de células PCNA positivas no tecido conjuntivo em cada grupo e período de avaliação.



Diferença estatisticamente significativa intergrupo.

*

Diferença estatisticamente significativa com o período de 7 dias do mesmo grupo.

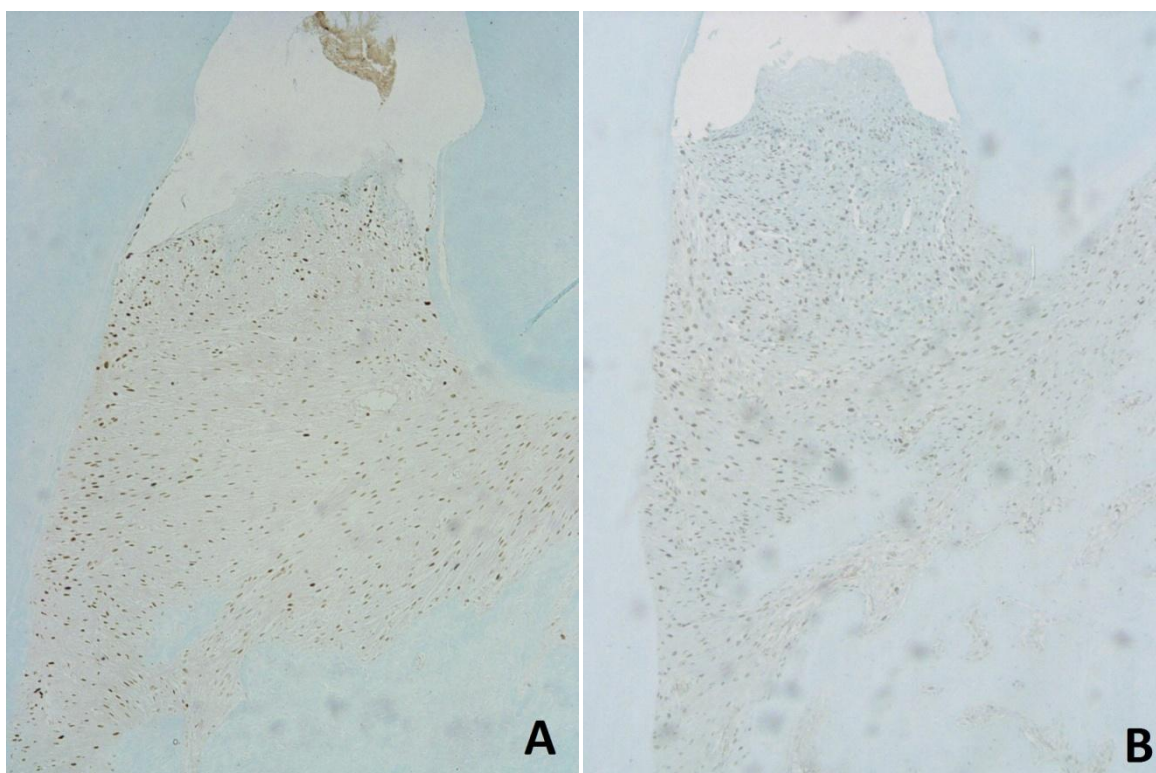


Figura 5. Fotomicrografia da região interproximal dos molares inferiores esquerdos do grupo PE (A) e grupo 5-FU/PE (B) aos 7 dias. Coloração Fast Green. Aumento original 100x.

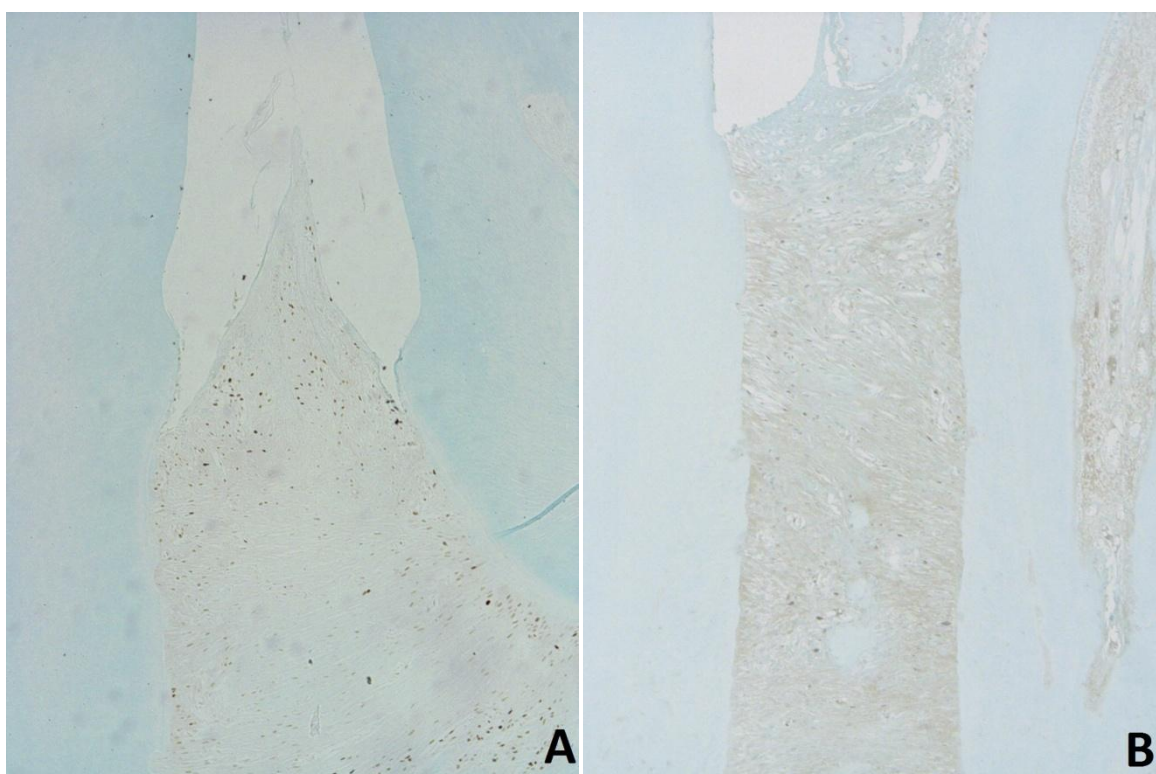


Figura 6. Fotomicrografia da região interproximal dos molares inferiores esquerdos do grupo PE (A) e grupo 5-FU/PE (B) aos 15 dias. Coloração Fast Green. Aumento original 100x.

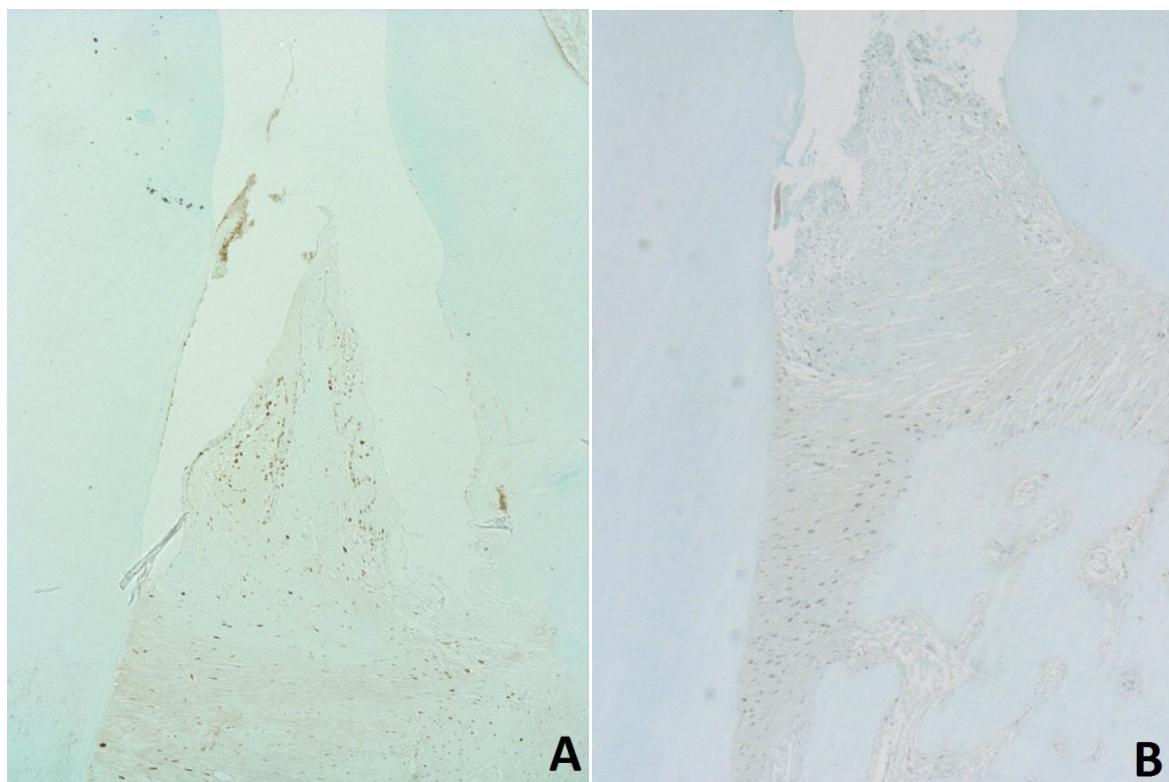


Figura 7. Fotomicrografia da região interproximal dos molares inferiores esquerdos do grupo PE (A) e grupo 5-FU/PE (B) aos 30 dias. Coloração Fast Green. Aumento original 100x.

5-Discussão

Na análise dos resultados do presente estudo pode-se observar que houve no tecido epitelial menor imunomarcção de células PCNA positivas nos animais submetidos a quimioterapia com 5-FU aos 30 dias, quando comparado as animais que não foram expostos a quimioterapia. Com relação ao tecido conjuntivo houve maior imunomarcção de células PCNA positivas nos animais submetidos a quimioterapia aos 7 dias, quando comparado aos não expostos. Na análise intra-grupo do tecido conjuntivo e tecido epitelial houve uma maior imunomarcção no grupo PE aos 15 e 30 dias, quando comparado aos 7 dias. Esses resultados demonstraram que o 5-FU altera a proliferação celular de células normais do tecido epitelial, podendo alterar a integridade da mucosa, o que poderia facilitar a penetração de microrganismos periodontopatogênicos nos tecidos periodontais, visto que o epitélio é a primeira barreira de defesa inata dos tecidos periodontais, além de reduzir a proliferação de fibroblastos gengivais.

Pode se observar no presente estudo que durante o processo de reparação tecidual ocorreu um momento em que houve uma grande proliferação celular. Com o tempo a marcação de PCNA foi decaindo visto que as células que proliferaram passaram por um processo de diferenciação. No grupo PE provavelmente esse aumento da proliferação tenha ocorrido antes dos 7 dias operatórios, e aos 7 dias já estava ocorrendo um decréscimo, pois estava ocorrendo a diferenciação. No entanto no grupo 5-FU/PE como existe um comprometimento da resposta tecidual e da reparação celular, o aumento da proliferação ocorreu aos 7 dias dando a falsa impressão de que no grupo 5-FU/PE o PCNA era mais elevado, quando na verdade esse pico é provavelmente retardado em relação ao grupo PE.

A imunomarcção para PCNA foi realizada para esclarecer os efeitos do 5-FU sobre os tecidos periodontais de revestimento. O PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular

(PCNA) é um marcador biológico capaz de fornecer informações sobre diferenciação, proliferação celular e também como um meio auxiliar de diagnóstico no caso de células tumorais. Trata-se de uma proteína nuclear ácida que varia durante o ciclo celular, e aumenta da fase G1 para a S do ciclo celular (POOSARI et al., 2015). Esta técnica é capaz de avaliar o número de células presentes no ciclo celular, mas dá informações quanto ao tempo em que cada célula completa o seu ciclo celular. Sendo assim, não é possível determinar se o elevado número de células PCNA positivas é devido ao alto “turnover” ou se indica uma grande proporção de células dividindo-se em prolongado ciclo celular (ARISAWA et al., 1999).

Arisawa et al. (1999) também descreveram que, segundo Mighell, 1995, o PCNA não é considerado um bom marcador de proliferação celular, no caso de diagnóstico patológico, devido à influência de fatores que podem alterar o número de células PCNA positivas, como o tipo de fixador, o tempo de fixação, estado do espécime, e por ser a meia vida do PCNA longa, o núcleo de uma célula pode permanecer PCNA positivo, mesmo depois de cessado o estímulo de proliferação celular. Com relação ao presente estudo todas as amostras foram processadas ao mesmo tempo, e foram utilizados bons fixadores, fixadas pelo mesmo tempo, a fim de controlar e eliminar fatores que poderiam interferir negativamente na imunomarcação do PCNA.

Por outro lado, Theodoro et al. (2016) não verificaram alteração do número de células PCNA positivas na região de furca de dentes com periodontite experimental em ratos, diferente do ocorrido neste estudo que avaliou a região interproximal de dentes com periodontite experimental, verificamos que o 5-FU aumentou a proliferação celular no tecido conjuntivo no período de 7 dias e diminuiu significativamente essa proliferação aos 15 dias e 30 dias tanto no tecido conjuntivo como epitelial da região interproximal avaliada.

Theodoro et al. (2016) demonstraram que 5-FU significativamente promove maior destruição dos tecidos periodontais e inibe o processo de reparação do tecido ósseo alveolar de áreas com

periodontite experimental. Além disso, um estudo anterior realizado também por nossa equipe mostrou que a terapia mecânica em animais tratados com 5-FU foi menos eficaz que nos animais não tratados, destacando a necessidade de uso de terapias coadjuvantes do tratamento periodontal em condições de quimioterapia (GARCIA et al., 2015)

O presente estudo demonstrou que o 5-FU pode alterar a proliferação celular de células normais como dos queratinócitos, e isto poderia facilitar a formação de úlceras e a entrada de microrganismo nos tecidos periodontais, corroborando os achados dos estudo prévio de nosso grupo em que foi demonstrado maior perda óssea alveolar em áreas com periodontite em ratos submetidos a quimioterapia com 5-FU (GARCIA et al., 2015; THEODORO et al., 2016).

O Protocolo de tratamento quimioterápico com 5-FU consistiu na administração por injeção intraperitoneal realizada em dois momentos no dia da instalação da ligadura (60 mg/kg) e 48 horas (40mg/kg) após a instalação da ligadura baseado em estudo prévio de Medeiros et al. (2011), onde verificaram a presença de graus diferentes de mucosite em ratos submetidos a este protocolo de quimioterapia. O 5-FU foi o fármaco de escolha do nosso grupo de pesquisa, por se tratar de um quimioterápico de grande escala no tratamento de tumores sólidos, como por exemplo, os de cabeça e pescoço, ovário e mama.

GARG e GUEZ (2011) comprovaram que o 5-FU é o fármaco mais associado à mucosite, provocando a destruição de células que se desenvolvem muito rápido, como por exemplo, células tumorais e também células da mucosa. Tais fatos podem ser justificados já que o 5-FU é um análogo de pirimidina que compromete a síntese de DNA e RNA (THEODORO et al., 2016). Estas lesões ulcerativas podem ocorrer ao longo do trato gastrointestinal e geralmente são tão dolorosas que podem fazer com que o paciente não consiga ingerir alimentos (GARG e GUEZ, 2011).

Depois da entrada no compartimento intracelular, 5-FU é convertido em vários metabolitos ativos, incluindo trifosfato fluorouridina, monofosfato fluorodesoxiuridina e

trifosfato fluorodesoxiuridina (LONGLEY, 2003). O trifosfato fluorouridina é incorporado no RNA e provoca a inibição do processamento de pre-ribosomal RNA (GHOSHA, 1994).

As manifestações orais, incluindo mucosite, dor, sangramento, xerostomia e perturbações do paladar, podem ocorrer durante e após a quimioterapia (HONG et al., 2010). Além disso, a susceptibilidade do hospedeiro a infecções bacterianas, fúngicas e virais podem aumentar, e tais mudanças na microbiota bucal podem tornar esses microrganismos potencialmente mais patogênicos (SONIS et al., 2004).

MAZZEO et al. (2008) relataram que uma maior atenção deve ser dada ao tratamento periodontal como terapia coadjuvante ao tratamento oncológico, pois de todas as manifestações orais apresentadas durante a quimioterapia a única que não foi reversível em seu estudo foi o aumento do sulco gengival, propiciando o aumento do número de bactérias bem como a ocorrência da doença periodontal, mostrando dessa forma a importância de uma inter-relação entre os profissionais (médico e cirurgião dentista) durante o tratamento desses pacientes.

Recentemente tem sido destacado na literatura que o cuidado com a saúde oral é essencial no tratamento de pacientes oncológicos, bem como métodos de prevenção e tratamento das doenças bucais devem ser indicados a estes pacientes com muito rigor. Os Institutos Nacionais de Consenso de Desenvolvimento da Saúde recomendam a avaliação oral odontológica antes, durante e após as terapias oncológicas (MAZZEO et al., 2008). No entanto, ainda são escassos os estudos na literatura que avaliem os efeitos de diferentes protocolos de quimioterapia utilizados recentemente no tratamento de neoplasias malignas, bem como o mecanismo de ação destes fármacos nos tecidos periodontais na ausência ou presença de doença. Assim estudos adicionais são necessários para entender completamente a ação dos quimioterápicos nos tecidos periodontais saudáveis e nos tecidos afetados pelas doenças periodontais, bem como para estabelecer terapias coadjuvantes que possam promover

maior eficácia do tratamento periodontal durante e após a quimioterapia, ou métodos que possam prevenir a instalação ou reduzir a severidade dos tecidos periodontais melhorando a resposta imunológica dos pacientes.

6-Conclusão

Conclui-se que o 5-FU tem um efeito negativo na proliferação celular tanto no tecido conjuntivo como no tecido epitelial atrasando o processo de reparação e comprometendo a integridade estrutural dos tecidos de áreas com periodontite experimental em ratos.

REFERÊNCIAS

1. **ARIAS JL.** Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules*. 2008 Oct 1; 13(10):2340-69.
2. **ARISAWA H, YAMASHITA Y, OGAWA H, MASUNAG H, HHIGASHIO K.** Deleted form of hepatocyte growth factor ameliorates the mortality rate of severe thermal injury in rats. *Surgery*. 1999 Nov;126(5):925-3
3. **DARVEAU RP** The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system.2009,*DNA Cell Biol* 28(8):389–395
4. **DJURIC M, CAKICS, HADZI-MIHAILOVIC M, PETROVIC D, JANKOVIC L.** Oral status in patients receiving 5-fluorouracil for colorectal cancer.*J BUON*.2010 Jul-Sep; 15(3):475-9. PubMed PMID:20941813
5. **FERNANDES LA, ALMEIDA JM, THEODORO LH, BOSCO AF, NAGATA MJH, MARTINS TM, OKAMOTO T, GARCIA VG.** Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*, v. 36, p. 219-228, 2009.
6. **GARCIA RL, COLTRERA MD, GOWL AM.** Analysis of proliferative grade using PCNA / cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues- comparison with flow- cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, v. 134, p. 733-9, 1989
7. **GARCIA VG, FERNANDES LA, MACARINI VC, ALMEIDA JM, MARTINS TM, BOSCO AF, NAGATA MJ, CIRELLI JA, THEODORO LH.** Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol*. Dec; v. 38 n. 12 p. 1106-14, 2011.
8. **GARCIA VG, GUALBERTO JÚNIOR EC, FERNANDES LA, BOSCO AF, HITOMI NAGATA MJ,CASATTI CA, ERVOLINO E, THEODORO LH.** Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced

periodontitis in rats with ovariectomy. J Periodontol. 2013 Apr; v. 84 n. 4 p. 556-65, 2013.

9. **GARCIA VG, LONGO M, GUALBERTO JÚNIOR EC, BOSCO AF, NAGATA MJ, ERVOLINO E, THEODORO LH**, Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. Journal of Periodontal Research, v 49, Issue 5, p 584–594, 2014.
10. **GARCIA VG, NORONHA VC, ALMEIDA JM, LONGO M, ERVOLINO E, BOMFIM SRM, THEODORO LH**, Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. Support Care Cancer. 2015 Jul;23(7):2007-17.
11. **GARG A, GUEZ G**. Head and neck cancer, dental implants, and dental oncology. Dent Implantol Update. 2011 Jan;22(1):1-8.
12. **GHOSHAL K, JACOB ST**. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. Cancer Res. 1994;54(3):632–636
13. **GRANSTRÖM G**. Craniofacial osseointegration. Oral Dis. 2007 May;13(3):261-9.
14. **GUO S, DIPIETRO LA**. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 2010 Mar;89(3):219-29.
15. **HONG CH, NAPENASS JJ, HODGSON BD et al**. Dental Disease Section, Oral Care Study Group, Multi-national Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology(ISOO). A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. Support Care Cancer 2010;18:1007–1021.

16. **JENSEN SB, MOURIDSEN HT, BERGMANN OJ, REIBEL J, BRUNNER N, NAUNTOFTE B.** Oral mucosal lesions, microbial changes, and taste disturbances induced by adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Aug;106(2):217-26. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.04.003. Epub 2008 Jun 13.

17. **LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG.** 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.*2003;3(5):330–338

18. **MAZZEO MA, LINARES JA, CAMPOS ML, BUSAMIA BE, DUBERSARSKY C, LAVARDA M, JARCHUM G, FINKELBERG AB.** Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. 2009 Mar 1;14(3):E108-1

19. **MEDEIROS CA, LEITÃO RF, MACEDO RN, BARBOZA DR, GOMES AS, NOGUEIRA NA, ALENCAR NM, RIBEIRO RA, BRITO GA.**Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis.*Cancer Chemother,Pharmacol.* 2011.May;67(5):1085-100.

20. **PETERSON, LJ, ELLIS III, E, HUPP JR, TUCKER, MR.** *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea.* 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 880p.

21. **POOSARI A, PROMTHETS, KAMSA-ARDS, SUWANRUNGRUANG K, LONGKUL J, WIANGNON S.** Hormonal contraceptive use and breast cancer in Thai women. *J Epidemiol.* 2014;24(3):216-20. Epub 2014 Mar.

22. **SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D et al.** Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement,epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 2004;100:1995–2025

23. **THEODORO LH, LONGO M, ERVOLNO E, DUQUE C, FERRO-ALVES ML, ASSEM NZ, LOUZADA LM, GARCIA VG.** Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitinduced in rats subjected to 5-

fluorouracil chemotherapy. Journal of periodontal research,doi:10.1111/jre.12347

24. **VANHOECKE B, DE RTCK T, STRINGER A, VAN DE WIELE T, KEEFE D** (2014) Microbiota and their role in the pathogenesis of oralmucositis.Oral Dis.
doi:10.1111

ANEXO I - CERTIFICADO DA APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.



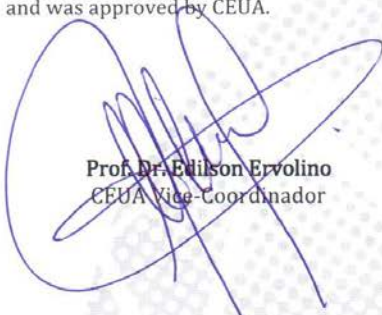
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e imunológico" sob responsabilidade da Pesquisadora LETÍCIA HELENA THEODORO e colaboração de Valdir Gouveia Garcia and Mariéllen Longo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00800-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of different protocols of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of the induced periodontitis in rats treated with chemotherapy: a histomorphometric, immunohistochemical and immunologic study", process number 00800-2012, under responsibility of LETÍCIA HELENA THEODORO and with collaboration of Valdir Gouveia Garcia and Mariéllen Longo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador