



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

CAMILA KHIRALLAH FONSECA

**INFLUÊNCIA DA DROGA QUIMIOTERÁPICA 5-FLUOROURACIL
SOBRE A EVOLUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA: ESTUDO HISTOMÉTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientadora: Prof^a Dr^a Letícia Helena Theodoro

ARAÇATUBA – SP
2013

Dedicatória

*Aos meus pais, **Jacqueline Khirallah Fonseca e José Carlos Fonseca**, pelo apoio, carinho, amor e dedicação. Só tenho a agradecer, sem vocês nada disso seria possível. Muito obrigada!*

Agradecimentos

À Professora Dr^a Letícia Helena Theodoro, que nos anos de convivência, me orientou e contribuiu para o meu aprendizado intelectual e científico. Agradeço pela confiança, amizade, disponibilidade, paciência, incentivo e colaboração.

À Doutoranda Mariéllen Longo, pela amizade, colaboração, apoio e incentivo no desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, pela oportunidade única.

Epígrafe

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.” **Ayrton Senna**

Sumário

Introdução.....	8
Proposição.....	11
Materiais e Métodos.....	12
Resultados.....	16
Discussão.....	23
Referências.....	27
Anexos.....	33

FONSECA, CK. Influência da droga quimioterápica 5-fluorouracil sobre a evolução da periodontite experimental induzida: estudo histométrico. [Monografia]. Araçatuba: UNESP - Universidade Estadual Paulista, 2013.

RESUMO

O presente estudo avaliou via análise histométrica os efeitos do quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) na evolução da periodontite experimental (PE). Foram utilizados 48 ratos, separados aleatoriamente em 2 grupos e submetidos aos seguintes tratamentos: Grupo 1 (n=24) – animais normais, com indução da periodontite experimental (PE); Grupo 2 (n=24) - animais tratados sistemicamente com 5-FU, com indução de PE. A PE foi induzida pela adaptação de um fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Nos animais do G2 a droga 5-FU foi administrada no momento da indução da PE e após 48 horas. Após 7 dias da evolução da PE, nos animais dos grupos G1 e G2 a ligadura foi removida.

Os animais, em número de oito para cada grupo/tempo, foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura. Foram obtidos cortes seriados de 4 µm de espessura no sentido mésio-distal e corados com Hematoxilina e Eosina. A porcentagem de osso na furca (POF) foi avaliada por análise histométrica. A coleta sanguínea foi realizada nos seguintes momentos: 0 e -7 dias. Os leucócitos totais (LT) e neutrófilos foram avaliados. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$) em programa computacional especializado. Observou-se que os animais do grupo G2 ($34,20 \pm 19,01$; $40,03 \pm 13,08$) apresentaram menor POF quando comparados aos animais do grupo G1 ($66,20 \pm 9,09$; $66,23 \pm 11,82$) aos 7 ($p < 0,02$) e 30 ($p < 0,01$) dias respectivamente.

Os animais dos grupos G2, apresentaram redução dos LT e neutrófilos após tratamento com 5-FU. Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o 5-FU na dosagem utilizada agravou evolução da PE em ratos.

Palavras chaves: Perda óssea alveolar. Periodontite. Quimioterapia. Ratos.

FONSECA, CK. Influence of chemotherapy drug 5-fluorouracil on the evolution of experimental periodontitis induced: histometric study. [Monografia]. Araçatuba: UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

The present study evaluated via histometric analysis the effects of chemotherapy 5-fluorouracil (5-FU) in the evolution of experimental periodontitis (EP). A total of 48 mice were randomly separated into two groups and subjected to the following treatments: Group 1 (n = 24) - normal animals with induced experimental periodontitis (EP), Group 2 (n = 24) - animals treated systemically with 5-FU with PE induction. The PE was induced by adapting a cotton thread around the left mandibular first molar. In G2 animals the drug 5-FU was administered at the induction of PE and after 48 hours. After 7 days of evolution of PE, the animals of groups G1 and G2, the ligature was removed.

The animals, eight in number for each group / time were euthanized at 7, 15 and 30 days after removal of the bandage. Were obtained from serial sections of 4 mm thick in the mesio-distal and stained with hematoxylin and eosin. The percentage of bone in the furcation (POF) was evaluated by histometric analysis. The blood collection was performed at the following times: 0, -7 days. The total leukocytes (LT) and neutrophils were evaluated. The data were subjected to statistical analysis ($p < 0.05$) in specialized computer program. It was observed that the animals in group G2 (34.20 ± 19.01 , 40.03 ± 13.08) had lower POF compared to animals of G1 (66.20 ± 9.09 , 66.23 ± 11.82) to 7 ($p < 0.02$) and 30 ($p < 0.01$) days, respectively.

The animals in groups G2, showed reduction of LT and neutrophils after treatment with 5-FU. Within the present study it can be concluded that 5-FU dosage used in the development of PE deteriorated in rats.

Keywords: Alveolar bone loss. Periodontitis. Chemotherapy. Rats.

Introdução

As doenças periodontais caracterizam-se por serem processos infecciosos e inflamatórios que levam a destruição dos tecidos de suporte dos dentes, são causadas por microorganismos periodontopatogênicos e influenciadas por fatores locais e sistêmicos que podem alterar a resposta do indivíduo frente a agressão microbiana (ANDERSEN et al., 2007).

Frente às toxinas bacterianas, processos imuno-inflamatórios são desencadeados nos tecidos periodontais como forma de impedir que estes se disseminem ou invadam os tecidos (SCHENKEIN et al., 2006). Estes mecanismos constituem a defesa do hospedeiro, em alguns casos, podem ser prejudiciais, pois, são capazes de danificar ou destruir células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo, além do osso alveolar. Essas reações não são desencadeadas em resposta a uma simples espécie bacteriana, mas a uma infecção bacteriana mista e resultam na degradação das fibras colágenas, migração apical do epitélio juncional a partir da junção esmalte-cimento e perda do osso alveolar (LINDHE et al., 2010).

Também está definido na literatura que algumas condições sistêmicas podem interferir na resposta do hospedeiro frente aos fatores locais, como o tabagismo e o diabetes, que são consideradas condições de risco para a doença periodontal (LINDHE et al., 2010). Além disto, pacientes que estão em tratamento antineoplásico como a quimioterapia, merecem também atenção especial, principalmente porque as drogas utilizadas nesta terapia não apresentam seletividade entre a célula cancerosa e as células normais e, por esta razão, são lesivas a ambas (MCGUIRE et al., 2002).

No tratamento oncológico, os pacientes poderão ser submetidos à terapia cirúrgica, associada ou não à sessões de radioterapia ou quimioterapia. A quimioterapia ou radioterapia além dos efeitos sistêmicos devido a imunossupressão, também provocam efeitos indesejáveis na mucosa bucal, com o aparecimento das chamadas "mucosites orais". São lesões ulceradas da gengiva e mucosa oral que, além de dolorosas, podem se tornar porta de entrada de bactérias bucais (SACONO et al., 2008). Desta forma, estes pacientes ficam mais susceptíveis às infecções o que requer um controle intenso da placa bacteriana, que poderá iniciar-se antes mesmo do tratamento oncológico, com o objetivo de prevenir a contaminação (WILSON & REES et al., 2005). As complicações orais mais comuns são mucosite, infecção, dor,

sangramento e distúrbios do paladar. Hipossalivação também é comum nos pacientes tratados com quimioterapia (COMEAU et al., 2001), mas, a contribuição de fármacos citotóxicos a uma disfunção salivar é, neste momento, pouco clara (CHAUSHU et al., 1995). A quimioterapia foi durante anos focada na inibição de proliferação de células neoplásicas, entretanto, o câncer tem sido considerado uma doença com relativa deficiência de apoptose, ao invés, de um excesso de proliferação celular, sendo assim, os estudos tem focado o uso de quimioterápicos com potencial de indução de apoptose (GUCHELAAR et al., 1998). Vários são os quimioterápicos utilizados no tratamento oncológico tais como cisplatina, cladribina, ciclosfosfamida, citarabina, doxorubicina, etoposida, fludarabina, gemcitabina, metrotexate, paclitaxel, teniposide, vimblastina, vincristina e fluorouracil (GUCHELAAR et al., 1998).

A boca é altamente susceptível aos efeitos secundários tóxicos da quimioterapia de tumores malignos. Isto é por causa de vários fatores, incluindo um elevado volume de células da mucosa bucal, a presença de uma microflora diversa e complexa, e traumatismo aos tecidos orais durante o funcionamento normal (SONIS et al., 2001). Virtualmente todos estes problemas orais podem conduzir a eventos secundários que afetam a saúde geral do paciente. Por exemplo, durante a supressão imune, a cavidade oral, pode tornar-se uma fonte importante de infecção sistêmica (BARRETT et al., 1994). A infecção oral é uma complicação freqüente da terapia do câncer (BAQUERO et al., 1990). Há evidências consideráveis de que a microflora oral é uma fonte importante de infecção sistêmica em doentes imunossuprimidos (BERGMANN et al., 1991). Em circunstâncias normais, a boca é o lar de mais de 200 espécies microbianas. Como resultado do tratamento com antibióticos e da quimioterapia, o equilíbrio da microflora hospedeiro é alterada. A mudança para os números mais altos de bactérias patogênicas gram-negativas é tipicamente observada (BAQUERO et al., 1990). A mucosite pode conduzir a infecções locais e sistêmicas, num momento em que o paciente é mais susceptível (HEIMDAHL et al., 1999). Por isso, cuidado oral profilático antes e durante o tratamento do câncer é de extrema importância (ELAD et al., 2003).

Poucos são os estudos que avaliaram os efeitos de drogas quimioterápicas sobre os tecidos periodontais (JENSEN et al., 2008; NOVAES, 2013). O 5-Fluorouracil (5-FU- Fluoro-2,4- pirimidina), é um antimetabólito tipo análogo da pirimidina, que apresenta um amplo espectro de ação de atividade contra tumores sólidos (do trato gastrointestinal, pâncreas, ovário, fígado, cérebro, mama), isoladamente ou em regimes de quimioterapia em

combinação. Devido à sua estrutura, o 5-FU interfere com o metabolismo de nucleosídeos e pode ser incorporado no RNA e DNA, levando à citotoxicidade e morte celular (ARIAS, et al, 2008). O 5-FU é uma droga altamente indicada para tratamento de tumores malignos sólidos.

A falta de especificidade na sua biodistribuição sistêmica faz com que estas drogas atinjam tanto as células-alvo como as células saudáveis que possuem alto índice mitótico (Arias et al., 2008). Alguns estudos avaliaram os efeitos do 5-FU nos tecidos bucais e observaram aumento da produção de TNF- α e IL-1 β em mucosa jugal (MEDEIROS et al., 2010), aumento da inflamação gengival, aumento no índice de placa e de profundidade de sondagem (JENSEN et al., 2008).

Desta forma, este trabalho tem um caráter inédito, pois, irá avaliar a influência do quimioterápico na periodontite experimentalmente induzida em animais tratados com o quimioterápico (5-Fluorouracil).

2. Proposição

O presente estudo, tem por objetivo avaliar por meio de análise histométrica os efeitos do quimioterápico 5-FU na evolução da periodontite experimental (PE).

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados no presente estudo 48 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), por um período de 5 dias. Todos os protocolos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, (protocolo nº 00800-2012) (Anexo A). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a legislação em vigor.

3.2. Protocolo Experimental (Anexo B)

3.2.1. Protocolo da periodontite experimental e grupos experimentais

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

Nos primeiros molares inferiores esquerdos, foi induzida a PE pela instalação de um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº 24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) mantido em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos para induzir a PE (GARCIA, et al., 2011).

3.2.2. Coleta sanguínea e tratamento com o quimioterápico (5-FU)

Previamente a primeira administração de 5-FU, no dia da instalação da ligadura, (- 7) e 7 dias após a primeira administração do 5-FU, o volume sanguíneo dos animais de 0,5 ml, foi

obtido por punção cardíaca, utilizando seringa de 1 ml e agulha hipodérmica (30x8). O sangue foi acondicionado em microtubos do tipo Eppendorf, contendo anticoagulante (EDTA) a 10% e enviado para processamento e análise.

Os animais que foram tratados com o quimioterápico 5-FU (Fluorouracila, 250 mg, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) receberam injeção intraperitoneal no dia da instalação da ligadura (60mg/Kg) e 48 horas após (40mg/Kg) (Medeiros et al., 2010).

3.2.3 - Grupos Experimentais

Após 7 dias da colocação da ligadura e indução da periodontite experimental, a ligadura foi removida, e os animais foram separados aleatoriamente em 2 (dois) grupos experimentais utilizando um sistema de tabela computacional, sendo que o primeiro animal foi do primeiro grupo, o segundo do segundo grupo e assim até completar os grupos, para melhor padronização (FERNANDES et al., 2009). Os grupos foram definidos de acordo com os seguintes tratamentos: Grupo 1- G1 (n=24) – animais normais, com indução da Periodontite experimental (PE); Grupo 2- G2 (n=24) – animais tratados sistemicamente com 5-FU, com indução de PE.

3.2.4 Eutanásia

Os animais, em número de oito para cada grupo/tempo, foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura, por administração de dose letal de Tiopental (Cristália, Ltd, Itapira, SP, Brasil) (150mg/kg). As mandíbulas foram removidas e fixadas com paraformaldeído a 4% em 0,1 M de solução tamponada (pH 7.4) por 48 horas.

3.3. Processamento Laboratorial

Após fixação, os espécimes obtidos foram lavados em água corrente e descalcificados em solução de EDTA à 10%, com trocas semanais por um período médio de 8 semanas. Após inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados (4 µm) foram obtidos no sentido mésio-distal. Após a exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histométrica por microscopia de campo claro. Esta

seleção foi realizada por um examinador experiente, treinado e cego ao estudo (ML). Outro examinador calibrado e cego ao estudo (CKF) realizou a análise histométrica (de ALMEIDA et al., 2008).

3.4. Análise dos Resultados

3.4.1. Análise Clínica dos animais

Foram avaliadas as características clínicas dos animais e dos tecidos na cavidade bucal no dia da remoção da ligadura dos animais (dia 0) na área do primeiro molar inferior esquerdo, e nos tecidos adjacentes onde foi induzida a PE em todos os animais.

3.4.2. Análise do Peso corporal dos animais

A evolução do peso corporal dos animais do G1 e G2 foi avaliada durante os períodos de -7 (1º injeção da dose do 5-FU), -5 (2º injeção da dose do 5-FU), 0 (instalação da ligadura), 7, 15 e 30 dias, para avaliar a influência do efeito sistêmico do quimioterápico nos animais.

3.4.3. Análise dos Leucócitos Totais e Neutrófilos

As contagens de LT e neutrófilos foram realizadas por meio de contador de células automatizado (ABX Diagnostics, Montpellier, France), nos seguintes momentos: -7 dias e 0 dias. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada segundo a Técnica de FELDMAN et al., (2000).

3.4.4. Análise histométrica

Para a determinação da Porcentagem óssea na área de furca (POF) foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740

Jena, Germany). A área total da furca (AF) e a área ocupada por tecido ósseo (AO), foram mensuradas, respectivamente, ambas em mm². A AF foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada a partir do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A partir desta linha seguiu-se todo o contorno da superfície externa do cimento situado entre as raízes.

A AO teve o mesmo limite apical da AF e partir deste seguiu-se todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A POF foi calculada multiplicando-se AO por 100 e dividindo-se por AF ($POF = (AO \times 100) / AF$). A POF de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados. As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente com nível de significância de 5% (NOVAES, 2013).

3.4.5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados histométricos, de neutrófilos e LT e peso corporal coletados foram testados pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil). A análise da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro Wilk ($p < 0,05$).

A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa na POF entre os diferentes grupos e períodos foi testada. A análise intragrupo e intergrupo para POF foi realizada pela análise de variância a dois critérios ANOVA ($p < 0,05$). Quando o ANOVA detectou diferença estatística, as comparações múltiplas foram realizadas e complementadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise intragrupo e intergrupo do número de LT e Neutrófilos de cada grupo e período foi realizada utilizando o Test t de Student ($P < 0,01$). A análise intragrupo e intergrupo do peso dos animais em cada grupo e período foi realizada utilizando o teste ANOVA a dois critérios ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Análise Clínica dos animais

Na análise clínica dos animais tratados com o 5-FU pode-se observar no momento 0 (dia da remoção da ligadura) a presença de hemorragia sanguínea ao redor dos olhos da maioria dos animais, os quais apresentavam-se em grande parte com diarreia. Com relação a análise clínica intrabucal, a maioria dos animais apresentavam mucosite na área do primeiro molar inferior esquerdo, e nos tecidos adjacentes onde foi induzida a PE.

4.2. Análise do Peso corporal dos animais

Os resultados estão apresentados na figura 1. Os animais do G2 demonstraram menor peso nos períodos de 0, 7 e 15 dias quando comparados ao G1 ($p<0,05$). Houve uma grande redução do peso destes animais com relação ao G1, e a partir de 7 dias (momento 0), após a administração do 5-FU, o peso dos animais do G2 aumentou gradativamente até quase se igualar ao peso dos animais do G1 no período de 30 dias.

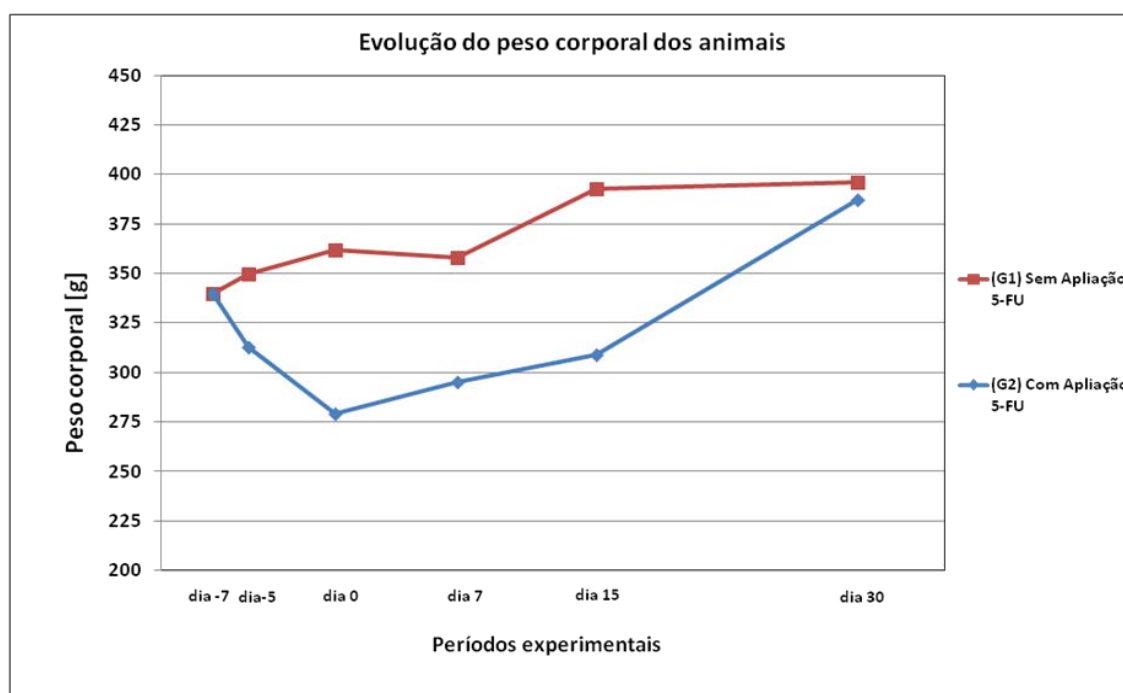


Fig. 1. Análise do Peso corporal dos animais (g) do G1 (sem aplicação do 5-FU) e G2 (com aplicação do 5-FU), em cada período.

4.3. Análise dos LT e Neutrófilos

Os resultados estão apresentados na fig. 2. Na análise intragrupo observou-se menor número de LT ($p=0,0018$) e de neutrófilos ($p<0.001$) no G2 momento 0, quando comparado ao período de -7 dias. Na análise comparativa entre os grupos observou-se menor número de LT ($p<0,001$) e de neutrófilos ($p<0,001$) no G2 quando comparado ao G1 no momento 0. Os animais do grupo sistemicamente saudável, representados pelo G1 não apresentaram diferença estatística significativa no número de LT e neutrófilos entre os períodos.

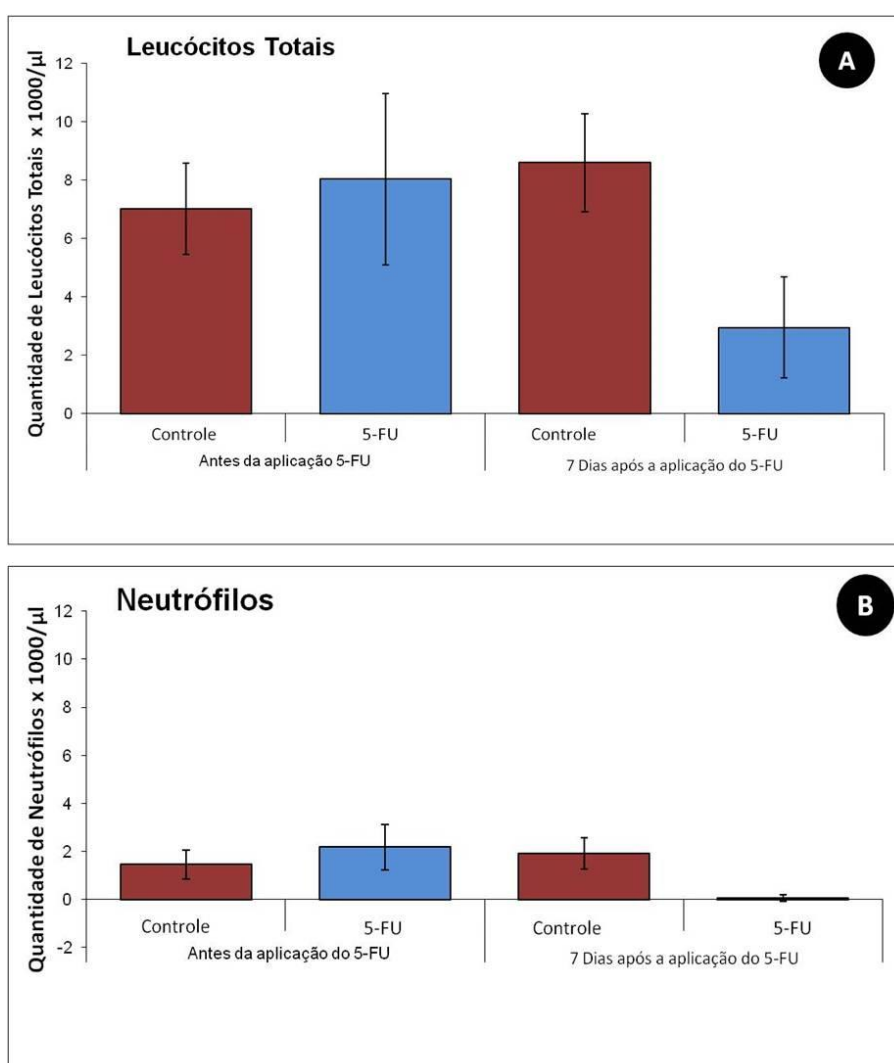


Fig. 2. (A) Média do número de leucócitos totais no sangue em cada grupo experimental em dois momentos. (B) Média do número de neutrófilos no sangue em cada grupo experimental em dois momentos.

4.4. Análise histométrica

Os resultados estão apresentados na tabela 1. Na análise intragrupo, ao comparar os diferentes períodos, não houve diferença estatística significativa. Na análise intergrupo ao se comparar os diferentes grupos experimentais, observou-se que nos animais do G2 ($34,20 \pm 19,01$; $40,03 \pm 13,08$) houve menor POF quando comparados aos animais do grupo G1 ($66,20 \pm 9,09$; $66,23 \pm 11,82$) aos 7 ($p=0,02$) e 30 dias ($p<0,01$) respectivamente (Figuras 3, 4 e 5).

Tabela 1: Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos da POF (%) na região de furca do primeiro molar inferior, de acordo com cada grupo e período.

G R U P O S	Períodos			
		7 dias	15 dias	30 dias
	G1	66,20±9,09 [*]	49,42±16,04	66,23±11,82 [§]
	G2	34,20±19,01	37,51±18,32	40,03±13,08
	N=	16	16	16

*Diferença estatisticamente significativa com o G2 aos 7 dias (ANOVA e Teste Tukey – $p<0,05$).

§ Diferença estatisticamente significativa com o G2 aos 30 dias (ANOVA e Teste Tukey – $p<0,05$).

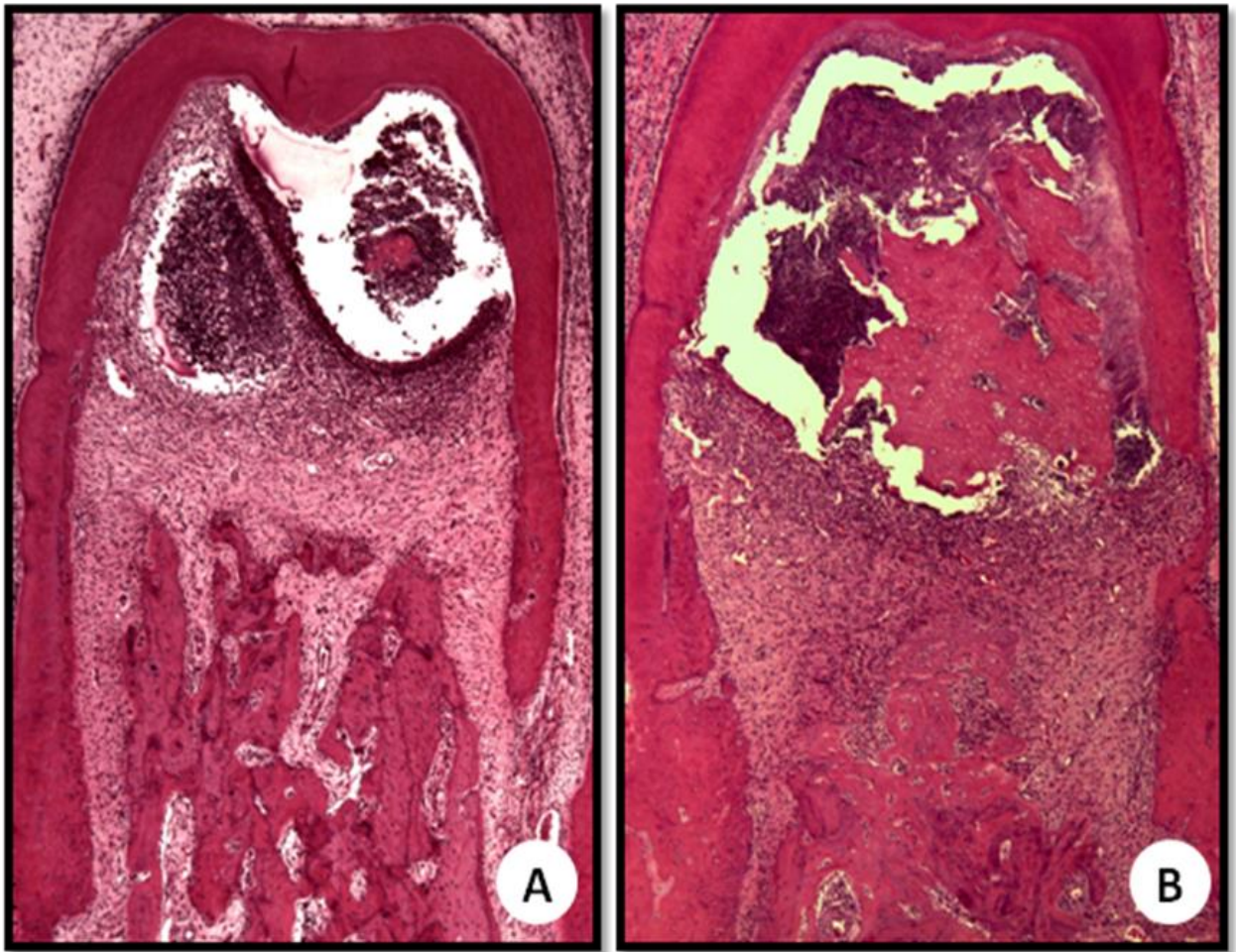


Fig. 3. Fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca, corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), evidenciando a porcentagem de osso na furca (POF) apresentada aos 7 dias pelos grupos G1(A) e G2 (B) (Aumento original 5x).

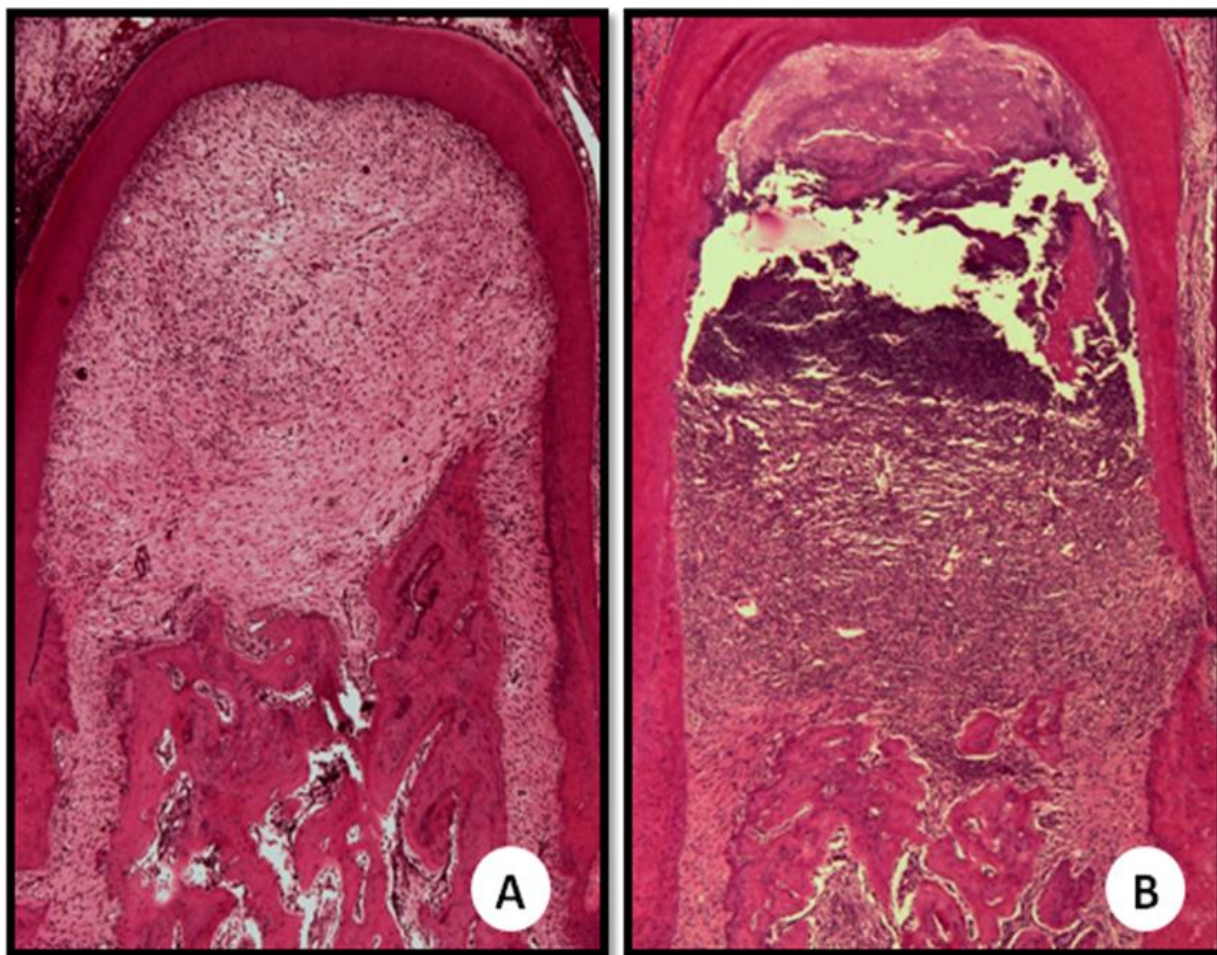


Fig. 4. Fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca, corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), evidenciando a porcentagem de osso na furca (POF) apresentada aos 15 dias pelos grupos G1(A) e G2 (B) (Aumento original 5x).

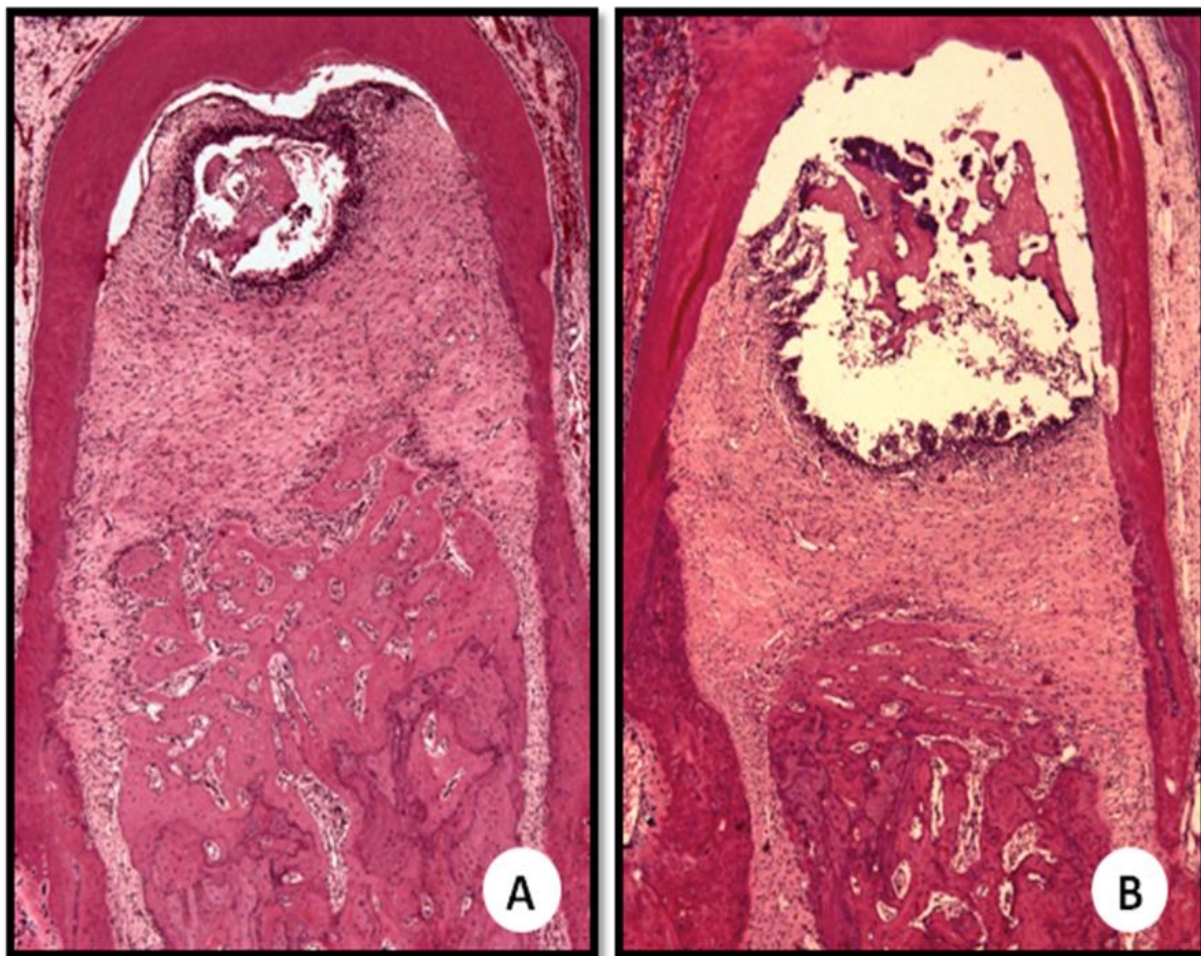


Fig. 5. Fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca, corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), evidenciando a porcentagem de osso na furca (POF) apresentada aos 30 dias pelos grupos G1(A) e G2 (B) (Aumento original 5x).

5. Discussão

No presente estudo foi utilizado um modelo animal em ratos para se avaliar o efeito do tratamento com 5-FU na evolução da PE. O efeito do quimioterápico 5-FU na dosagem utilizada (60mg/Kg e 40mg/Kg) de acordo com Medeiros et al., 2010, proporcionou uma redução do peso corporal dos animais que foram tratados com o 5-FU (G2) comparado com os animais não tratados com 5-FU (G1) até os 7 dias após a sua administração. Após o momento 0, ou seja, 7 dias após a administração de 5-FU o peso dos animais do G2 aumentou gradativamente até quase se igualar aos pesos dos animais do G1. De acordo com Xian et al. 2006, uma única dose de 5-FU (150mg/Kg) diminui consideravelmente o ganho de peso corporal (g) dos animais tratados com 5-FU comparado aos animais normais, estas evidências são confirmadas nos resultados deste estudo, demonstrando o efeito sistêmico do quimioterápico em duas doses menores de aplicação.

A perda de peso corporal apresentada pelos animais, pode estar relacionada com os efeitos adversos como a mielossupressão e mucosite do trato digestório (HORTOBAGYI 1997; ZHANG, et al., 2005; SONIS et al. 2004), o que pode ter contribuído neste animais para perda de apetite e desidratação devido a ocorrência de diarreia.

Na análise sanguínea o leucograma mostrou que os animais tratados com 5-FU (G2) apresentaram leucopenia com significativa redução no número de neutrófilos. Resultado semelhante foi observado por estudos anteriores (BRANDA et al., 2002; MIZOGUCHI et al., 2009) e confirmado por outro estudo recente que analisou a PE em ratos (NOVAES, 2013). Estudo recente em ratos utilizando o quimioterápico 5-FU na dosagem de 80 e 40 mg/Kg de peso corporal (NOVAES, 2013) demonstrou também uma redução de leucócitos totais e neutrófilos nos primeiros 7 dias, nos animais tratados com 5-FU.

Leucopenia é um evento bem conhecido em pacientes tratados com a maioria dos agentes quimioterápicos (LIMA et al., 2005). Os neutrófilos são produzidos pela medula óssea, e são importantes para detectar e eliminar microrganismos (GLAUSER et al., 2000). A diminuição no número de neutrófilos aumenta a vulnerabilidade do hospedeiro e consequentemente a severidade da doença periodontal (NUALART-GROLLMUS et al., 2007).

A metodologia de análise da porcentagem de tecido ósseo na área de furca foi baseada em estudo recente (NOVAES, 2013), devido ao perfil de similaridade da perda óssea deste estudo com o presente estudo o qual demonstrou áreas de sequestro ósseo na furca de animais tratados com 5-FU. Os animais tratados com 5-FU submetidos à PE (G2) apresentaram menor POF quando comparados com os animais sem 5-FU submetidos à PE (G1) aos 7 e 30 dias, respectivamente, no qual apresentou extensas áreas de necrose óssea envolvendo a quase totalidade do osso na área de furca. Os resultados obtidos mostram que o 5-FU agravou a severidade da PE. No entanto, aos 15 dias os animais tratados com 5-FU (G2) não apresentaram diferença estatisticamente significativa com os animais não tratados (G1).

Os resultados deste estudo são corroborados pelo estudo de NOVAES, em 2013, o qual demonstrou menor POF nos animais não-tratados com 5-FU e submetidos a PE quando comparados aos animais com PE e tratados com 5-FU aos 7, 15 e 30 dias. O estudo de NOVAES (2013) apresentou uma menor POF nos animais tratados com 5-FU em relação ao presente estudo, o que pode ser explicado pelas diferenças da dose do quimioterápico 5-FU, utilizada no trabalho, que foi maior que a do presente estudo, o que pode ter favorecido uma maior severidade da doença periodontal em relação aos animais do presente estudo. Tal fato, pode ser justificado devido a variabilidade ampla da ocorrência, severidade e duração dos efeitos adversos, além de diferentes intensidades de dose e combinações de agente quimioterápico (JENSEN et al., 2008), tais como mecanismo de citotoxicidade, concentração da droga e duração de exposição (GUCHELAAR et al., 1998).

O 5-FU por ser um quimioterápico é citotóxico para células que possuem um alto índice de proliferação (ARIAS et al., 2008). Vários estudos tem demonstrado que o 5-FU causa morte celular por apoptose nos tecidos, como no epitélio intestinal (IJIRI et al., 1983; PRITCHARD et al 1998; 1999), bem como linhas de células epiteliais (TONG et al., 2000). Bultzingslowen et al. (2001), relatou que o 5-FU induz alteração nos queratinócitos no epitélio oral via um processo consistente de degeneração autofágica. Além disso, o 5-FU promove uma severa leucopenia na fase inicial do tratamento, como observado no presente estudo, o que reduz a capacidade de defesa do hospedeiro (NAIDU et al., 2004).

Uma possível explicação para os resultados da análise histométrica deste estudo pode ser a supressão da atividade osteoblástica ocasionada pela droga (XIAN et al., 2006; RAGHU NADHANAN et al., 2012). Xian et al (2004), utilizando um modelo de quimioterapia em ratos jovens, mostrou que uma única injeção de 5-FU causou uma rápida e significativa

supressão na proliferação de células na placa de crescimento e metáfise; e indução de apoptose na metáfise, fornecendo evidências in vivo que o 5-FU danifica o mecanismo de crescimento ósseo.

Agentes quimioterápicos como o 5-FU tem mostrado causar osteopenia severa por suprimir células formadoras ósseas (osteoblastos) e promover o recrutamento de osteoclastos (XIAN et al., 2008; XIAN, et al., 2007).

Nadhanan et al., (2012) mostrou que o quimioterápico 5-FU induziu uma condição inflamatória no osso por regulação de citocinas pró-inflamatórias e fatores regulatórios de osteoclasto. Isto sugere que o 5-FU aumenta o número de osteoclastos, e pode ser capaz de criar um microambiente inflamatório no osso causando um aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias, que podem estimular a reabsorção óssea osteoclástica.

Estas evidências são uma possível explicação para os resultados apresentados no presente estudo, onde os animais tratados com 5-FU apresentaram uma severa destruição do tecido ósseo logo no período inicial de 7 dias e após 30 dias, mostrando uma intensa atividade osteoclástica.

6. Conclusão

Diante dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que o 5-FU, na dosagem utilizada, agravou a evolução da PE em ratos, no entanto estudos adicionais são necessários para compreender plenamente o mecanismo de ação do 5-FU nas respostas celulares do periodonto com PE.

7. Referências Bibliográficas

1. ANDERSEN, R.; LOEBEL, N.; HAMMOND, D.; WILSON, M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **J. Clin. Dent.**, v. 18, p. 34-38, 2007.
2. ARIAS, J.L. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. **Molecules**, v.13, p.2340-2369, 2008.
3. BAQUERO, F.; FERNANDEZ, J.; DRONDA, F.; ERICE, A.; PEREZ, J.O.; REGUERA, J.A.; REIG, M. Pathogenesis and immune mechanisms of anaerobic bacteremia in neutropenic patients: an oral source. **Rev. Infect Dis.**, v. 12(Suppl. 2), p. 157–160, 1990.
4. BARRETT, A.P.; SCHIFTER, M. Antibiotic strategy in orofacial/head and neck infections in severe neutropenia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 77, p. 350–355, 1994.
5. BERGMANN, O.J. Alterations in oral microflora and pathogenesis of acute oral infections during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukemia. **Scand. J. Infect Dis.**, v. 23, p. 355–366, 1991.
6. BRANDA, R.F.; CHEN, Z.; BROOKS, E.M.; NAUD, S.J.; TRAINE, T.D. & MCCORMACK, J.J. Diet modulates the toxicity of cancer chemotherapy in rats. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine** v.140, 358-368, 2002.
7. BÜLTZINGSLÖWEN, I.V.; JONTELL, M.; HURST, P.; NANNMARK, U.; KARDOS, T. 5- Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. **Oral Oncology**, v. 37, p. 537-544, 2001.

8. COMEAU, T.B.; EPSTEIN, J.B.; CHRISTO, M. Taste and smell dysfunction in patients receiving chemotherapy: a review of current knowledge. **Support Care Cancer**, v. 9, p.575–580, 2001.
9. CHAUSHU, G.; ITZKOVITZ-CHAUSHU, S.; YEFENOF, E.; SLAVIN, S.; Or, R.; GARFUNKEL, A.A. A longitudinal follow-up of salivary secretion in bone marrow transplant patients. **Oral Surg Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.79, p. 164–169, 1995.
10. de ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; BONFANTE; S. & GARCIA, V.G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 2156-2165, 2008.
11. ELAD, S.; GARFUNKEL A.A.; Or, R.; MICHAELI, E.; SHAPIRA, M.Y.; GALILI, D. Time limitations and the challenge of providing infection-preventing dental care to hematopoietic stem-cell transplantation patients. **Support Care Cancer**, v. 11, p. 674–677, 2003.
12. FELDMAN, B.F.; ZINKL; J.G. & JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. **Philadelphia**, ed.5, p.1344, 2000.
13. FERNANDES, L.A.; ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.H.; MARTINS, T.M.; OKAMOTO, T.; GARCIA, V.G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **J. Clin. Periodontol**, v. 36, p. 219-228, 2009.
14. GARCIA V.G.; FERNANDES L.A.; MACARINI V.C. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **J. Clin. Periodontol**, v. 38, p. 1106-1114, 2011.

15. GLAUSER M.P. Neutropenia: clinical implications and modulation. **Intensive Care Med.**, v. 26 (Suppl 1), p.103-110, 2000.
16. GUCHELAAR, H.J., VERMES, I.; KOOPMANS, R.P.; REUTELINGSPERGER, C.P.; HAANEN, C. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 42, P. 77-83, 1998.
17. HORTOBAGYI G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. **Drugs**, v. 54 (Suppl 4), p. 1-7, 1997.
18. HEIMDAHL, A. Prevention and management of oral infections in cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 7, p. 224–228, 1999.
19. JEFFERIES, S.; FOULKES, W.D.; Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol.**, v. 37, p. 115–126, 2001.
20. JENSEN, S.B.; MOURIDSEN, H.T.; BERGMANN, O.J.; REIBEL, J.; BRÜNNER, 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.**, v. 106, n.2, p. 217-226, 2008.
21. JENSEN S.B.; PEDERSEN A.M.; REIBEL, J.; NAUNTOFTE, B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. **Support Care Cancer**, v. 11, p. 207–225, 2003.
22. KIM, J.W.; CHA, Y.; KIM, S.J.; HAN, S.W.; OH, D.Y.; LEE, S.H.; Kim, D.W.; IM, S.A.; KIM, T. Y.; HEO, D.S. & BANG; Y.J. Association of oral mucositis with quality of life and symptom clusters in patients with solid tumors receiving chemotherapy. **Supportive Care in Cancer**, v. 20, p. 395-403, 2012.

23. LIMA V, BRITO G.C.A.; CUNHA F.Q.; REBOUÇAS C.G.; FALCÃO B.A.A.; AUGUSTO R.F. Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. J. Oral Sci.**, v.113, p.210-217, 2005.
24. LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. Patogênese da Periodontite. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 5a ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.127-152, 2010.
25. MEDEIROS, C.A.C.X.; LEITÃO, R.F.C.; MACEDO, R.N.; BARBOSA, D.R.M.M.; GOMES, A.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.C. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 67, p. 1085- 1100, 2010.
26. MIZOGUCHI, T.; MUTO, A.; UDAGAWA, N.; ARAI, A.; YAMASHITA, T.; HOSOYA, A.; NINOMIYA, T.; NAKAMURA, H.; YAMAMOTO, Y.; KINUGAWA, S.; NAKAMURA, M.; NAKAMICHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; NAGASAWA, S.; ODA, K.; TANAKA, H.; TAGAYA, M.; PENNINGER, J. M.; ITO, M. & TAKAHASHI, N. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v. 184, p. 541-554, 2009.
27. MCGUIRE, D.B. Mucosal tissue injury in cancer therapy: more than mucositis and mouthwashes. **Cancer Pract.**, v. 10, p. 179-191, 2002.
28. NAIDU, R. Chemotherapy-Induced and/or Radiation Therapy-Induced Oral Mucositis – Complicating the Treatment OF Cancer. **Neoplasia**, v. X, n. Y, 2004.
29. NOVAES, V.C.N. **Influência do 5-Fluorouracil nos tecidos periodontais normais, sobre a evolução e tratamento da doença periodontal experimental induzida.** 2013. 114 F. Tese (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

30. NUALART GROLLMUS, Z.C.; MORALES CHÁVEZ, M.C.; SILVESTRE DONAT, F.J. Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. *Medicina oral, Patología oral y Cirugía bucal*, v.12, p. 211-215, 2007.
31. RAGHU NADHANAN, R.; ABIMOSLEH, S.M.; SU, Y.W.; SCHERER, M.A.; HOWARTH, G.S. & Xian, C.J. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolismo*, v. 302, p. 1440-1449, 2012.
32. SACONO, N.T.; COSTA, C.A.; BAGNATO, V.S.; ABREU LIMA, F.C. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Lasers Surg. Med.*, v. 40, p. 625-633, 2008.
33. SONIS S.T.; PETERSON, D.E.; McGUIRE D.B. Mucosal injury in cancer patients: new strategies for research and treatment. *J. Natl. Cancer Monogr.*, v. 29, p.1–54, 2001.
34. SONIS, S.T.; ELTING, L.S.; KEEFE, D.; SCHUBERT, M.; HAUERJENSEN, M. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*, v.100, p.1995-2025, 2004.
35. SCHENKEIN, H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 40, p. 77-93, 2006.
36. XIAN, C.J.; HOWARTH, G.S.; COOL, J.; FOSTER, B.K. Effects of acute 5-Fluorouracil chemotherapy and insulin-like growth factor-I pretreatment on growth plate cartilage and metaphyseal bone in rats. *Bone*, v.35, p. 739-749, 2004.
37. XIAN, C.J.; COOL, J.C.; PYRAGIUS, T.; FOSTER, B.K. Damage and Recovery of the Bone Growth Mechanism in Young Rats Following 5-Fluorouracil Acute Chemotherapy. *J. of Cell Biochemistry*, v.99, p. 1688-1704, 2006.

38. XIAN C. J.; COOL J.C.; SCHERER M.A.; MACSAI C.E.; FAN, C.; COVINO, M.; FOSTER, B.K. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy induced bone growth defects. **Bone**, v. 41, p. 842-850, 2007.
39. XIAN, C.J.; COOL J.C.; SCHERER, M.A.; FAN, C.; FOSTER B.K. Folinic acid attenuates methotrexate chemotherapy-induced damages on bone growth mechanism and pools of bone marrow stromal cells. **J. Cell Physiol**, v. 214, p.777-785, 2008.
40. ZHANG, J.; TIAN Q.; YUNG, C.S.; ZHOU, S.; DUAN, W. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. **Drug Metab. Rev.**, v. 37, p.611-703, 2005.
41. WILSON, J.; REES, J.S. The dental treatment needs and oral side effects of patients undergoing outpatient cancer chemotherapy. **Eur. J. Prosthodont Restor. Dent.**, v. 13, p. 129-134, 2005.

Anexos

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



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

Anexo B – Delineamento do Estudo

