



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA



VIVIAN CRISTINA NORONHA NOVAES

***“Influência de drogas quimioterápicas
na evolução da periodontite
experimental em ratos”***

ARAÇATUBA – SP

2017



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA



VIVIAN CRISTINA NORONHA NOVAES

***“Influência de drogas quimioterápicas
na evolução da periodontite
experimental em ratos”***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia

ARAÇATUBA – SP

2017

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N935i Novaes, Vivian Cristina Noronha.
Influência de drogas quimioterápicas na evolução da
periodontite experimental em ratos / Vivian Cristina Noronha
Novaes. - Araçatuba, 2017
150 f. : 11 il. ; 1 tab.

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

1. Perda do osso alveolar 2. Doenças periodontais 3. Prepara-
ções farmacêuticas 4. Defeitos da furca 5. Modelos animais
I. T.

Black 6
CDD 617.63

Dados curriculares

Vivian Cristina Noronha Novaes

Nascimento: 15.07.1972 Penápolis- SP

Filiação: Adroaldo Mauro Ribeiro Noronha
Lilian Marcia Marques Navarro

1991-1995: **Graduação em Odontologia**
Faculdade de Odontologia de Lins

1996-1997: **Especialização em Periodontia**
Universidade Metodista de São Paulo - UMESP

2011-2013: **Pós-Graduação em Odontologia**
Nível de Mestrado - ÁREA DE PERIODONTIA
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2014-2017: **Pós-Graduação em Odontologia**
Nível de Doutorado - ÁREA DE PERIODONTIA
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

À Deus

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

Obrigada meu Deus por colocar ao meu lado uma família amorosa e compreensiva, amigos acolhedores e professores generosos. Com eles pude vivenciar momentos maravilhosos de aprendizado e crescimento pessoal.

Obrigada Senhor por todas as graças concedidas e por cada momento que esteve comigo, protegendo-me e guiando-me nesse longo caminho de grandes realizações. Devo a Ele todos os momentos de alegria e sucesso até aqui conquistado. Minha eterna gratidão por mais esta benção em minha vida!

“Tudo posso naquele que me fortalece”

(Filipenses 4:13)

Ao Meu Marido

*Dedico especialmente este trabalho ao meu marido **Pedro**, meu eterno amor,*

Você viveu comigo todas as emoções desta pós graduação que hoje termino. Sem seu imenso amor eu não teria conseguido. Sou grata pelo seu companheirismo e carinho. Seu incentivo, atenção e proteção tornam essa caminhada mais segura e tranquila. Obrigada por compreender minhas escolhas e tornar possível esta conquista.

Você foi a minha força nas vezes que fraquejei. Seu estímulo foi fundamental para cada conquista. Você acreditou em mim até mesmo quando eu já não acreditava. Sou feliz por ter você em minha vida.

Te amo sempre.

*“Assim como viver
sem teu amor não é viver
Não há você sem mim
e eu não existo sem você.”*

(Eu não existo sem você - Tom Jobim e Vinícius de Moraes)

Às Minhas Filhas

Às minhas amadas filhas *Laura e Helena.*

Vocês são minha alegria e razão de viver. O sorriso de vocês me dá forças para continuar caminhando, mesmo quando não sei o caminho.

Vocês trouxeram para minha vida um significado maior, mudando meus valores, prioridades e urgências. A cada dia tento aprender com vocês a mais importante e bela das profissões, ser mãe.

Reconheço que também se sacrificaram para esta conquista. Mudaram sua rotina, sofreram com minha ausência e de alguma forma compreenderam o meu momento.

Dedico a vocês, minhas filhas queridas, este trabalho e o meu amor eterno e infinito!

“O Amor é a única coisa que cresce à medida que se reparte.”

(O Pequeno Príncipe – Antoine de Saint-Exupéry)

Aos Meus Pais

À minha mãe *Lilian* (in memorian) ,ao meu pai *Abraão*

Ambos me deram o sustentáculo para a vida. Devo a vocês minha formação humana e profissional.

Os exemplos de responsabilidade, trabalho, respeito e solidariedade me tornaram uma pessoa capaz de amar e ser feliz.

Foi o incentivo em ir além, que sempre recebi de vocês, tendo em mente que através do esforço do nosso trabalho podemos alcançar grandes conquistas que me fizeram chegar à este momento.

Compartilho com vocês os méritos desta conquista.

Estarão sempre em meu coração.

Aos Meus Familiares

Família Noronha, Família Navarro e Família Norões

Dedico este trabalho às minhas famílias entrelaçadas pelo amor e comprometimento. Obrigada pelas orações e carinho. Sou especialmente grata pelo apoio constante ao meu marido Pedro e pelo acolhimento às minhas filhas Laura e Helena nos momentos que não pude estar completamente presente.

A toda a minha família, obrigada por caminharem ao meu lado! Mesmo distante, de alguma forma fizeram parte desta conquista.

“Muitas vezes basta ser:

*Colo que acolhe,
 braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que acaricia,
desejo que sacia,
amor que promove.”*

(Cora Coralina)

Ao meu orientador *Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida*, agradeço por estar ao meu lado nessa longa caminhada. Você me deu condições para alcançar objetivos que eu considerava além de minha capacidade. Você mostrou e valorizou o que eu tinha de melhor a oferecer. Confiou, acreditou em mim e sempre me tratou como uma parceira dos seus trabalhos. O valor dessas atitudes foram a razão fundamental que motivaram o meu caminhar na pós-graduação e chego ao final com orgulho imenso de ter sido sua orientada. Você é um professor cativante, inteligente e um exemplo de pesquisador. Mais que meu orientador, você se tornou um grande e inestimável amigo, que tenho prazer em compartilhar cada uma das minhas conquistas e me sinto feliz com as suas. Sua responsabilidade e cuidado comigo foram fundamentais para que eu conseguisse concluir esse trabalho, sempre disposto a me atender em todos os momentos. Obrigada por me escutar, me apoiar e me obrigar a sempre seguir em frente. Obrigada pela sensibilidade em apontar meus erros e novos desafios, me ajudando a vencê-los.

Minha sincera gratidão e admiração por você.

Ao meu coorientador *Prof. Dr. Valdir Guveia Garcia*, pela confiança depositada em mim, por ter me orientado durante toda esta caminhada e compartilhando comigo algo que não tem preço: Conhecimento.

O senhor esteve comigo no início de minha vida acadêmica, e foi a inspiração para uma de minhas escolhas mais importantes na vida profissional. Com muito orgulho digo que fui sua aluna.

O destino nos reaproximou depois um longo tempo e neste reencontro o senhor me ofereceu uma oportunidade nova, ampliando definitivamente meu horizonte. Nesse momento que alcanço essa grande conquista agradeço imensamente por ter me acolhido com tanta generosidade.

Sou grata por todas as suas orientações e conselhos que vão além do âmbito científico, sempre com uma postura humilde e acolhedora. O seu exemplo como professor e pesquisador sempre irão me acompanhar. Muito obrigada pela oportunidade e por ter contribuído para este momento se tornar realidade!

À **Prof.^a Dr.^a. Leticia Helena Theodoro**, muito obrigada pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos transmitidos. Além de todo reconhecimento pela sua ajuda, disponibilidade e companheirismo. Muito obrigada por permitir fazer parte de alguns de seus projetos. Trabalhar ao seu lado é um aprendizado imenso.

Como professora é um exemplo de serenidade, humildade e dedicação ao ensino e pesquisa. Admiro-lhe pela forma tranquila e competente com que conduz tudo que faz, sempre com um grande sorriso no rosto. Exemplo de mulher forte e inteligente. Conviver com você foi um presente, obrigada por tudo!

À **Prof.^a Dr.^a. Suelly Bonfim**, e sua equipe do Curso de Medicina Veterinária. Agradeço pela grande colaboração profissional, contribuindo para a elaboração e execução desse trabalho. Professora apaixonada pelo que faz, competente e profissional. Em muitas ocasiões estive pessoalmente realizando nosso experimento, dividindo o tempo que dedica a sua família para nos ajudar. Obrigada pelo convívio agradável e carinhoso. É sempre um prazer estar em sua companhia!

Ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, sou grata pela presença real, constante e segura em todos os nossos trabalhos. Além da excelência em todas as análises, cada reunião para discussão do trabalho se tornava uma aula enriquecedora e acima de tudo divertida, na qual o que parecia difícil e obscuro se tornava óbvio. Obrigada por transmitir com paixão seus conhecimentos e pela dedicação e contribuição neste e em todos os trabalhos que eu pude participar.

Ao **Prof. Álvaro Bosco**. Que prazer poder conviver com o senhor nos nossos encontros semanais! Pude apreciar toda sua sabedoria e técnica, transmitidas de forma primorosa e humilde! Além de ser um dos grandes nomes da periodontia, o senhor é um ser humano espetacular e agradeço pela oportunidade de poder estar presente em

alguns momentos. Aqueles que além de transmitir os conhecimentos inerentes a profissão, nos ensinam os caminhos da vida e como percorre-los são os que chamamos de Mestres. O senhor é um Mestre! Meu muito obrigado!

*À **Prof. Drª Maria José Hitomi Nagata**, agradeço por ter me concedido a oportunidade de estudar nesta casa, referência de grandes nomes da periodontia nacional, para que eu pudesse aprimorar meus conhecimentos na especialidade que tanto amo. Também agradeço por apoiar meus primeiros passos nessa fascinante caminhada e mostrar-se disponível quando necessário.*

Professora exemplo de dedicação à pesquisa e à docência, estando sempre empenhada com o crescimento do programa de Pós-graduação desta instituição.

Receba minha gratidão, carinho e admiração neste momento.

*“Ensinar não é transferir conhecimento,
mas criar possibilidades para a sua produção ou a sua construção.
Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender.”*

(Paulo Freire)

Agradeço aos meus amigos queridos do Team Almeida, pessoas incríveis que o professor Juliano me proporcionou conviver e apreciar. Juntos tivemos momentos de trabalho intenso, alegrias e companheirismo, comprovando que unidos no mesmo objetivo o trabalho se torna leve e podemos ir mais longe. **Giovani e Clara**, obrigada por toda a ajuda, comprometimento e disponibilidade na execução desse trabalho. Sempre trabalharam duro e com um sorriso no rosto, deixando tudo mais leve. Vocês foram fundamentais e me surpreenderam de diversas formas. O mérito desse trabalho também é de vocês! **Nathália, Fred e Bianca** obrigada por sempre estarem disponíveis e muitas vezes deixarem seus compromissos para atender ao chamado da “chefa”. **Henrique e David** meus meninos de ouro! Quando a minha memória falhava ou os desafios tecnológicos eram demais para meu entendimento, lá estavam Henrique ou David com o frescor e entendimento da juventude para me socorrer. Obrigada pelo comprometimento, ajuda e paciência comigo. Vocês tem morada em meu coração! **Breno e Fiorin**, que chegaram de fininho e conquistaram minha admiração. Obrigada pela convivência gostosa e disponibilidade.

Aos meus amigos eternos que conquistei no início dessa caminhada e que para sempre levarei em meu coração **Eriuan, Mariellen, Natália de Campos, Paula, Carol e Nathalia Pola**. Serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim. Conviver com vocês foi fundamental para minha jornada e agradeço por tudo o que me ensinaram. Nesses anos de pós graduação convivi com muitos colegas que marcaram minha vida, mas nada se compara as lembranças deixadas pelos colegas do início dessa jornada. São amigos que acompanharam e participaram de uma transformação pessoal profunda, às vezes sofrida, às vezes intensamente gratificante. Deixaram uma pedaço de suas almas comigo e levaram um pedaço da minha consigo.

Aos colegas da periodontia que estiveram durante meu doutorado, *Alessandra, Marcio, Marina, Martha, Daniela Janjacomio, Daniela, Joao e Luan.*

Obrigada pela alegre convivência. Boa sorte e que seus sonhos se realizem!

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

À atual coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Prof. Adj. **André Luiz Fraga Briso**, por sua dedicação ao Curso e gosto pela docência.

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

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

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

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos, Lilian Sayuri Mada** pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

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

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

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

A **Dirce**, sempre disposta a nos ensinar e ajudar, obrigada pela constante disposição e convivência.

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

Aos pacientes, que nos depositando confiança, deram-nos a oportunidade de aprender e a satisfação de tratá-los no decorrer deste curso.

Aos animais, por servir à humanidade com suas vidas.

À **CAPES**, pela concessão da Bolsa de Doutorado

À **FAPESP** pela concessão do Auxílio à Pesquisa (Processo nº 2011/03021-3) para realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram durante todo o decorrer do curso e que passaram em minha vida e colaboraram no desenvolvimento da pessoa que hoje sou.

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

OBRIGADA!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

Novaes, VCN. **Influência de drogas quimioterápicas na evolução da periodontite experimental em ratos.** [Tese]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2017.

Objetivo: Este estudo avaliou comparativamente a influência dos quimioterápicos 5-fluotouracil (5-FU) e Cisplanina (CIS) para tratamento de câncer no periodonto saudável, sobre a evolução da periodontite experimental (PE) e as funções hepáticas e renais de ratos portadores de PE submetidos ao tratamento com os quimioterápicos 5-FU ou CIS. **Materiais e Métodos:** foram utilizado 90 ratos machos distribuídos em 6 grupos. Grupo SPE-SS (n = 15): animais que receberam injeções de 0,5 ml de solução salina 0.9% (SS) sem indução da PE (grupo *Sham*). Grupo PE-SS (n = 15): animais que receberam injeções s de 0,5 ml de SS e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-5FU (n=15): animais que receberam injeções de 5-Fluorouracil (5-FU) sem indução da PE. Grupo PE-5FU (n = 15): animais que receberam injeções de 5-FU e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-CIS (n = 15): animais que receberam injeções Cisplatinas (CIS) sem indução da PE. Grupo PE-CIS (n = 15): animais que receberam injeções de CIS e indução da PE após a primeira injeção. Para indução da PE foi adaptado um fio de algodão número 24 ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo. Decorridos 07, 15 e 30 dias após a primeira injeção intraperitoneal (SS ou quimioterápicos) os animais foram eutanaziados. Foi realizada coleta sanguínea para análises hematologia e bioquímicas de aspartato aminotransferase (AST), alamina aminotransferase (ALT), creatinina e uréia previamente as injeções e aos 07 e 30 dias, totalizando 60 dos 90 ratos. Foram coletadas as mandíbulas contendo os primeiros molares inferiores e processadas de acordo com as análises propostas. Para a análise fotométrica avaliou-se a perda óssea alveolar ao redor

do primeiro molar inferior. Para a análise de microtomografia computadorizada (μ CT) avaliou-se a porcentagem de volume de tecido ósseo (PVTO) na região de furca. As hemimandíbulas contralaterais foram utilizadas para análises histomorfométrica e imunoistoquímicas na região de furca e avaliou-se a porcentagem de área sem osso (PASO), características histológicas e análises dos biomarcadores (TRAP, RANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β , PCNA, BAX e HIF-1 α ,). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). **Resultado:** ambos os quimioterápicos 5-FU e CIS contribuíram para o agravamento da evolução da PE por duas vias: aumentando a intensidade e duração do processo inflamatório; e diminuindo a capacidade de reparo tecidual por redução do “turnover” celular e vascular, resultando de forma significativa na maior perda óssea, que comparativamente foi maior nos animais que receberam aplicação sistêmica de 5-FU do que de CIS. Adicionalmente a PE associada ao 5-FU apresentou de maneira significativa maiores níveis de ALT e AST aos 30 dias e associada a CIS apresentou de maneira significativa maiores níveis de Uréia e não apresentou diferença significativa nos níveis de Creatinina. **Conclusão:** ambos os quimioterápicos, 5-FU ou CIS, exacerbaram a severidade da periodontite, sendo que os danos periodontais causadas pelo 5-FU foram comparativamente maiores e mais intensos do que os causados pela CIS. Adicionalmente, podemos concluir que a PE agravou de forma sinérgica as condições debilitantes hepáticas e renais ocasionadas pelos quimioterápicos.

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

Novaes, VCN. **Influence of chemotherapeutics drugs on the evolution of experimental periodontitis in rats.** [Thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2017.

Objective: This study evaluated the influence of chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) and Cisplatin (CIS) for the treatment of cancer in healthy periodontium, on the evolution of experimental periodontitis (EP), and liver and kidney function of rats with EP treated with chemotherapeutic agents. **Materials and Methods:** 90 male rats were distributed in 6 groups. Group SPE-SS (n = 15): animals that received injections of 0.5 ml of 0.9% saline solution (SS) without PE induction (Sham group). Group PE-SS (n = 15): animals that received injections of 0.5 ml of SS and induction of PE after the first injection. Group SPE-5FU (n = 15): animals receiving injections of 5-Fluorouracil (5-FU) without induction of PE. Group PE-5FU (n = 15): animals receiving injections of 5-FU and induction of PE after the first injection. SPE-CIS group (n = 15): animals that received Cisplatin injections (CIS) without PE induction. PE-CIS group (n = 15): animals that received CIS injections and PE induction after the first injection. For EP induction a cotton thread number 24 was fitted around the first right and left lower first molars. After 07, 15 and 30 days after the first intraperitoneal injection (SS or chemotherapeutic) the animals were euthanized. Blood samples were collected for hematological and biochemical analyzes of AST, ALT, creatinine and urea before injections and at 07 and 30 days. The mandibles containing the mandibular first molars were collected and processed according to the proposed analyzes. For the photometric analysis, alveolar bone loss (ABL) around the lower first molar was evaluated. For the analysis of computerized microtomography (μ CT) the percentage of bone tissue volume (PBTv) in the furcation region was evaluated. The contralateral hemimandibula were

used for histomorphometric and immunohistochemical analyzes in the furcation region and the percentage of bone-free area (PBFA), histological characteristics and biomarkers analysis (TRAP, RANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β , PCNA, BAX and HIF-1 α). Data were submitted to statistical analysis ($p < 0.05$). **Results:** Both chemotherapy 5-FU and CIS contributed to the worsening of the evolution of EP by two routes: increasing the intensity and duration the inflammatory process; and decreased tissue repair ability by reducing cell and vascular turnover, resulting in significantly greater bone loss, which was comparatively higher in animals treated with 5-FU than in CIS. Additionally, 5-FU associated PE significantly increased ALT and AST levels at 30 days and associated CIS significantly increased Urea levels and showed no significant difference in Creatinine levels. **Conclusion:** both chemotherapy, 5-FU or CIS, exacerbated the severity of periodontitis, and periodontal damage caused by 5-FU was comparatively bigger and faster than those caused by CIS. In addition, we can conclude that PE has synergistically aggravated the liver and kidney debilitating conditions caused by chemotherapy.

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

Capítulo 1

Tabela 1	Porcentagem de espécimes por escore dos parâmetros da Análise Histológica da região de furca do primeiro molar inferior de acordo com cada grupo e período.	84
----------	---	----

Capítulo 1

- Figura 1** **A:** Gráfico mostrando média e desvio padrão da PVTO na região de furca do primeiro molar inferior. Abreviações: ¶ diferença estatisticamente significativa aos 30 dias no mesmo grupo; ¶ diferença estatisticamente significativa aos 7 dias no mesmo grupo; † diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE para o mesmo período; ‡ Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-5FU para o mesmo período; § Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-CIS para o mesmo período; (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$). **B-D:** Imagens da μ CT para análise volumétrica da área de furca do primeiro molar inferior usando o plano sagital dos grupos SPE-SS, SPE-5FU e SPE-CIS aos 7 dias. **E-G:** Imagens da μ CT para análise volumétrica da área de furca do primeiro molar inferior usando o plano sagital dos grupos PE-SS, PE-5FU e PE-CIS aos 7 dias. Observar menor preenchimento ósseo na área de furca nos animais que receberam 5-FU ou CIS. **H-J:** Imagem tridimensional gerada pelo software dos grupos PE-SS, PE-5FU e PE-CIS aos 30 dias. 85
- Figura 2** **A:** Gráfico mostrando média e desvio padrão da PASO na região de furca do primeiro molar inferior. Abreviações: ¶ Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 15 dias. † Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE nos mesmos períodos. ‡ Diferença estatisticamente significativa com PE-SS nos mesmos períodos. § Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p < 0,05$). **B-D:** Fotomicrografia mostrando o efeito da quimioterapia em tecido periodontal saudável. Periodonto da região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (B) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (C) ou CIS (D). **E-J:** 86

Fotomicrografias mostrando o efeito da quimioterapia na progressão da periodontite experimental. Características histológicas da região de furca do primeiro molar inferior de ratos portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia após 7 e 30 dias (E / H). Características histológicas da região de furca de ratos portadores de PE e que foram submetidos a quimioterapia com 5-FU (F / I) e CIS (G / J) após 7 e 30 dias. Abreviatura: oa osso alveolar. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Ampliação original: x50. Barras de escala: 400 μ m.

Figura 3

A: Padrão de imunomarcção para TRAP no osso alveolar da região de furca do primeiro molar inferior em ratos. **B:** Gráfico mostrando média e desvio padrão das células TRAP positivas em cada grupo e período. Abreviações: ¶ Diferença estatisticamente significativa com 7 dias no mesmo grupo; † Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE no mesmo período; ‡ Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-SS no mesmo período. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$). **C-K:** Padrão de imunomarcção de células TRAP positivas no osso alveolar aos 7 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia. **L-M:** Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para células RANKL positivas no osso alveolar aos 7 dias. **O-P:** Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para células OPG positivas no osso alveolar aos 30 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (C) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (F) ou CIS (I). Região de furca do primeiro molar inferior de ratos portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia (D, E, L, O) e ratos portadores de PE e que foram submetidos a quimioterapia com 5-FU (G, H, M, P) ou CIS (J, K, N, Q). Setas pretas: células TRAP positivas (A-K),

células RANKL positivas (L-M). Abreviatura: oa osso alveolar; lp ligamento periodontal. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Ampliação original: C, F e I 200x; D, G e J 400x, A, E, H, K-Q 1000x. Barras de escala: A, 10 μ m; E, H e K, 20 μ m; L-K, 30 μ m; C, F e I, 50 μ m; D, G e J, 100 μ m.

Figura 4

A-C: Fotomicrografia mostrando padrão de imunomarcção para TNF α na região de furca aos 30 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (A) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (B) ou CIS (C). **D-F:** Fotomicrografia mostrando padrão de imunomarcção para IL-1 β na região de furca aos 15 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (A) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (B) ou CIS (C). Setas pretas: TNF α (A-C), IL-1 β (D-F). Abreviatura: oa osso alveolar. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Ampliação original: 1000x. Barras de escala: 100 μ m.

88

Figura 5

A: Gráfico mostrando média e desvio padrão das células PCNA positivas em cada grupo e período. Abreviações: ¶ Diferença estatisticamente significativa com 7 dias no mesmo grupo; || Diferença estatisticamente significativa com 15 dias no mesmo grupo; † diferença estatisticamente significativa com o grupo SPE-SS no mesmo período; ‡ Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-SS no mesmo período; § Diferença estatisticamente significativa com o grupo SPE-CIS para o mesmo período. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$). **B-D:** Padrão de imunomarcção de células PCNA positivas no osso alveolar aos 7 dias. **E-G:** Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para células HIF-1 α positivas no osso alveolar aos 15 dias. **H-J:** Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para células BAX positivas no osso alveolar aos 15 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos

89

portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia (B, E, H) e ratos portadores de PE e que foram submetidos a quimioterapia com 5-FU (C, F, I) ou CIS (D, G, J). Setas azuis: células PCNA positivas, setas pretas: células HIF-1 α positivas (E-G), células BAX positivas (H-J). Abreviatura: oa osso alveolar. Contra-coloração: Fast green (B-D), hematoxilina de Harris (E-J). Ampliação original: B-D 400x; E-J 1000x. Barras de escala: B-D, 40 μ m; E-J, 20 μ m.

Capítulo 2

- Figura 1** **A:** Gráfico mostrando média e desvio padrão da POA (vestibular e lingual) do primeiro molar inferior em cada grupo e período. Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias. ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU nos mesmos períodos. Ω Diferença estatisticamente significativa com PE-SS nos mesmos períodos. $\dagger$ Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$). **B-G:** Imagens representativas do osso alveolar vestibular (B-D) e lingual (E-G) dos animais não portadores de PE que não foram submetidos a quimioterapia (B/E) e submetidos a quimioterapia com 5-FU (C/F) ou CIS (D/G) aos 30 dias. **H-M:** Imagens representativas do osso alveolar vestibular (H-J) e lingual (K-M) dos animais portadores de PE que não foram submetidos a quimioterapia (H/K) e submetidos a quimioterapia com 5-FU (I/L) ou CIS (J/M). Setas pretas indicando a perda óssea alveolar. 119
- Figura 2** Gráfico mostrando média dos Leucócitos Totais em cada grupo no decorrer dos períodos. Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa com Baseline. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$). 120

- Figura 3 Gráfico mostrando média e desvio padrão dos níveis de ALT de acordo com cada grupo e período. 121
- Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com Baseline. π Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias. ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS nos mesmos períodos. Ω Diferença estatisticamente significativa com PE-5FU nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).
- Figura 4 Gráfico mostrando média e desvio padrão dos níveis de AST de acordo com cada grupo e período. 122
- Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com Baseline. π Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias. ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS nos mesmos períodos. Ω Diferença estatisticamente significativa com PE-5FU nos mesmos períodos. $\dagger$ Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).
- Figura 5 Gráfico mostrando média e desvio padrão dos níveis de AST de acordo com cada grupo e período. 123
- Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com Baseline. π Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias. ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS nos mesmos períodos. Ω Diferença estatisticamente significativa com PE-5FU nos mesmos períodos. $\dagger$ Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).
- Figura 6 Gráfico mostrando média e desvio padrão dos níveis de Ureia de acordo com cada grupo e período. 124
- Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com Baseline. $\dagger$ Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).

Lista de Abreviaturas e Siglas

μCT – microtomografia computadorizada

5-FU – 5 Fluorouracil

AF - área total da furca

ALT – Alamina Amina Transferase

ANOVA – Análise de Variância

AO - área ocupada por tecido ósseo

aPDT – Terapia Fotodinamica antimicrobiana

ARRIVE – “Animal Research: Reporting in Vivo Experiments”

AST – Aspartato Amina Transferase

BAX – “Bcl-2 associated protein X”

Bcl-2 – “B cell lymphoma protein 2”

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEEA – Comissão de Ética em Experimentação de Animais

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIS – Cisplatina

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA - Ácido desoxiribonucleico

DP - Doença Periodontal

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

FAPESP – Fundação de Amparo à pesquisa

FdUMP - monofosfato de fluorodesoxiuridina

g – Grama

GGT – Gama Glutamil Transferase

H&E - Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e Eosina

HIF-1 α – “Hypoxia-inducible factor 1-alpha”

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LLLT – “Low-Level Laser Therapy”

LT – Leucócitos Totais

mg – Miligramas

mg/Kg - Miligramas por quilogramas

mL - Mililitros, equivalente à milésima parte do litro

mm² – Milímetros quadrado

MMPs – Metaloproteinases da matriz

NHANES – “National Health and Nutrition Examination Survey”

OMS – Organização mundial de saúde.

OPG – Osteoprotegerina.

PASO – Porcentagem de área sem osso.

PCNA – “Proliferating cell nuclear antigen”

PCR – proteína C reativa

PE – Periodontite experimental.

POA – perda óssea alveolar.

POF - Porcentagem de Osso na região de Furca

RANK – Receptor ativador de NF- Kappa B

RANKL - Receptor ativador de NF-Kappa B ligante

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular

RNA - Ácido ribonucleico mensageiro

ROI – região tridimensional de interesse

SPE – Sem Periodontite Experimental

SS – Solução Salina.

TGF – Taxa de Filtração Glomerular

TLBI – Terapia com laser de baixa intensidade

TNF α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRAP - Fosfatase Ácida Tartarato Resistente

VEGF – “vascular endothelial growth factor”

VTO – porcentagem de volume de tecido ósseo.

μm – Micrometros

Lista de Anexos

Anexo

- A Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CCEA). 134

Anexo

- B Delineamento do Estudo. 135

Anexo

- C Figura representativa da região de interesse (ROI) da análise de Porcentagem de Volume de Tecido Ósseo (VTO). 135

Anexo

- D Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica e área adotada para contagem de células TRAP e PCNA positivas. 136

Anexo

- E Figura representativa da metodologia adotada para análise fotométrica. 136

Anexo

- F Normas para Publicação do Periódico “*Journal of Periodontology*” 137

Anexo

- G Normas para Publicação do Periódico “*Journal of Supportive Care in Cancer*” 146

Sumário

1 Introdução Geral.....	37
 2 Capítulo 1 - Estudo comparativo da influência da quimioterapia com 5-fluorouracil e cisplatina na progressão da periodontite experimental.	51
2.1 Resumo.....	53
2.2 Abstract.....	55
2.3 Introdução.....	57
2.4 Materiais e Métodos.....	60
2.5 Resultados.....	65
2.6 Discussão.....	70
2.7 Referências.....	77
 3 Capítulo 2 – Relação entre a periodontite experimental e drogas quimioterápicas nos danos hepáticos e renais em ratos.	90
3.1 Resumo.....	92
3.2 Abstract.....	94
3.3 Introdução.....	96
3.4 Materiais e Métodos.....	100
3.5 Resultados.....	104
3.6 Discussão.....	107

3.7 Referências.....	113
4 Considerações Finais	125
Anexos.....	133

Introdução

Geral

Introdução Geral

Proporcionar qualidade de vida aos pacientes submetidos ao tratamento oncológico é uma busca constante, principalmente após o aumento da expectativa de vida obtida pelas novas terapias de combate ao câncer. Por outro lado, a OMS estima que o aparecimento anual de novos casos de câncer irá aumentar dos 14 milhões registrados em 2012 para 22 milhões dentro das próximas duas décadas (WHO 2014). O tratamento convencional para o câncer é baseado, atualmente, em três importantes modalidades: cirurgia, radioterapia e quimioterapia citotóxica. A retirada cirúrgica de um tumor primário é um tratamento necessário e efetivo para um grande número de tipos de câncer (SHURIN, 2009). Já a terapia com quimioterapia citotóxica se baseia na administração de uma dose máxima tolerável das drogas escolhidas, com o objetivo de promover a erradicação do maior número de células tumorais. O principal efeito adverso da quimioterapia está relacionado com a toxicidade aguda e acumulada para os tecidos normais, incluindo as células do sistema imune. Assim, a quimioterapia convencional está comumente associada com uma variedade de efeitos colaterais, inclusive mielossupressão e diminuição da viabilidade e número de células (SALTZ & KEMENY, 1996; HALF & ARBER, 2009).

Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, o 5-Fluorouracil (5-FU) e a Cisplatina (CIS) são drogas amplamente utilizadas durante a quimioterapia (TAYLOR et al., 1994; LORCH et al., 2011; VERMORKEN et al., 2014), sendo que a CIS também pode ser utilizada durante a radioterapia em razão do seu potencial radiosensibilizador (DEWIT, 1987). A CIS é um composto com ampla atividade antineoplásica, sendo utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, dentre os quais os de testículo, pulmão, ovário, esôfago, cabeça e pescoço, mama e o

carcinoma de bexiga (WANG & LIPPARD, 2005; PANG et al., 2007; ZHANG et al., 2009). A molécula de cisplatina possui um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia e torna-se ativa pela reação de moléculas de água com os íons cloreto, reagindo, assim, com biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (WANG & LIPPARD, 2005; CHO et al., 2008). Sabe-se que a atividade antitumoral da cisplatina é resultado da sua interação com o DNA. Esta molécula ao entrar na célula, sofre reações que deixam a platina disponível para se ligar a bases do DNA e formar vários tipos de aductos que podem dar origem a ligações cruzadas intra e intercadeia (WOZNIAK et al., 2004; WANG & LIPPARD, 2005; RABIK & DOLAN, 2007). As alterações mais frequentemente observadas no DNA são os aductos entre guaninas adjacentes, que representam cerca de 65% de todas as lesões; 25% são representadas por aductos entre guanina e adenina e o restante é formado por ligações cruzadas intercadeias (KARTALOU & ESSIGMANN, 2001; RABIK & DOLAN, 2007; KOBERLE et al., 2010). Os aductos cisplatina-DNA podem inibir processos celulares fundamentais que incluem replicação, transcrição, tradução e reparo de DNA (WOZNIAK et al., 2004; CHO et al., 2008).

Com relação ao 5-FU, este é um antimetabólito do tipo análogo da pirimidina, com amplo espectro de ação contra tumores sólidos de cabeça e pescoço, trato gastrointestinal, ovário, fígado, cérebro e mama (ARIAS, 2008). Após sua entrada na célula, o 5-FU interfere com o metabolismo dos nucleosídeos e é incorporado a todas as classes de RNA por meio da RNA-polimerase. Adicionalmente, o fluorouracil forma o monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), que incorporado a timidilato sintase leva a inibição desta enzima impedindo a síntese de timidilato, que é um precursor necessário do DNA. A ação do 5-FU sobre o DNA e o RNA promove a toxicidade e

morte celular (NOORDHUIS et al., 2004; ARIAS, 2008; WISNIEWSKA-JAROSINSKA et al.; 2011).

Os quimioterápicos antineoplásicos atuam no metabolismo das células que possuem rápido crescimento e proliferação, como as células cancerígenas, induzindo sua apoptose (GUCHELAAR et al., 1998; ARIAS, 2008). 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, 2008). Desta forma, a cavidade oral é alvo frequente dos efeitos tóxicos dos agentes antineoplásicos por apresentar tecidos com rápida divisão celular, comparável aos tumores malignos. (GUGGENHEIMER et al., 1997; MCGUIRE, 2002; NAIDU et al., 2004). No periodonto, o epitélio juncional é responsável pela adesão dentogengival e tem um papel fundamental na defesa dos tecidos periodontais (TSUKAMOTO et al., 2012). Por ser um tecido com rápida proliferação ele pode ter sua renovação comprometida pela ação dos quimioterápicos, o que pode favorecer a penetração e contaminação dos tecidos mais profundos, incluindo os que compõem o periodonto de inserção. Por outro lado, o 5-FU pode bloquear a proliferação de osteoblastos e induzir sua apoptose em placas de crescimento ósseo (XIAN et al., 2006). Além desta ação, o 5-FU pode afetar o sistema RANK-RANKL-OPG, um dos sistemas reguladores do metabolismo ósseo, resultando no aumento das células clásticas TRAP-positivas (RAGHU NADHANAN et al., 2012, GARCIA et al., 2015). Com relação a CIS, esta promove um efeito negativo sobre a resposta tecidual frente a inflamação em defeitos ósseos (STINE et al., 2014). Desta forma, estas alterações podem favorecer o desenvolvimento da doença periodontal (DP).

A DP é uma doença imuno-inflamatória em que o desafio microbiano induz a resposta inflamatória do hospedeiro, que em indivíduos susceptíveis resultará na

destruição dos tecidos periodontais (CEKICI et al., 2014; SANZ et al., 2017). A patogênese da doença periodontal pode ser influenciada tanto por fatores etiológicos locais como sistêmicos, sendo que drogas que interagem com a resposta imune do hospedeiro podem alterar sua progressão (NASSAR et al., 2009; FERNANDES et al., 2009; ALANI & SAYMOUR, 2014). Estudos clínicos demonstraram que a quimioterapia provocou aumento do índice gengival (JENSEN et al., 2008; DJURIC et al., 2010), alterações na resposta inflamatória gengival, aumento na profundidade de sondagem (MAZZEO et al., 2009; DJURIC et al., 2010) e aumento dos índices de placa e sangramento (DJURIC et al., 2010). Ogawa et al., 2012 constataram que a periodontite ocorreu com maior frequência em pacientes que receberam tratamento quimioterápico. Além disso, estudos concluíram que o tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes submetidos a quimioterapia para tratamento de câncer é capaz de promover melhoras na condição periodontal (VOZZA et al., 2015; VARGAS-VILLAFUERTE et al., 2016), porém com resultados menos favoráveis comparados aos pacientes com periodontite sem câncer (VARGAS-VILLAFUERTE et al., 2016).

Contudo para entender os mecanismos pelo qual os quimioterápicos influenciam na patogênese da PE, são necessários estudos experimentais. Dentre os poucos estudos experimentais realizados, Garcia e colaboradores (2015) e Theodoro e colaboradores (2016) avaliaram que o tratamento sistêmico com quimioterápico 5-FU em animais portadores de PE resultou em maior destruição do osso alveolar na região de furca, maior infiltrado inflamatório e maior padrão de imunomarcção para RANKL (GARCIA et al. 2015; THEODORO et al. 2016), demonstrando que o 5-FU é capaz de agravar o desenvolvimento da PE. Além disso, foi demonstrado que o tratamento mecânico convencional de raspagem e alisamento radicular (RAR) não foi capaz de estabelecer adequado processo de reparo no periodonto comparado aos animais que não

receberam aplicação sistêmica de 5-FU (GARCIA et al. 2015), porém o uso de terapia coadjuvante à RAR como múltiplas sessões Terapia com Laser de Baixa Intensidade (TLBI) obteve uma melhor resposta ao tratamento da PE em ratos submetidos ao tratamento com 5-FU (THEODORO et al. 2016, THEODORO et al., 2017). Entretanto, além de maiores esclarecimentos com relação a influência do 5-FU na patogênese da DP, que irá colaborar com a fundamentação das terapias coadjuvantes adequadas às condições estabelecidas pelo quimioterápico, também existe a necessidade da avaliação da influência de outras drogas quimioterápicas sobre a patogênese da DP, dentre as quais a CIS que é amplamente utilizado no tratamento de canceres. Desta forma, é de suma importância o entendimento da influência dos quimioterápicos sobre a patogênese da DP para que se possa entender seu potencial modificador na etiologia do desenvolvimento da DP.

É importante ressaltar que a frequência e a severidade das condições debilitante do paciente frente a quimioterapia dependem de diversos fatores associados ao paciente e à terapia antineoplásica. Existem variáveis importantes que aumentam a susceptibilidade do paciente, dentre elas temos a droga utilizada, dose e regime quimioterápico e intensidade da imunossupressão (EPSTEIN & SCHUBERT, 1999; KNOX et al., 2000; DUNCAN & GRANT, 2003; BROWN et al., 2009). Além disso, as drogas quimioterápicas levam alterações significativas em diferentes órgão, podendo se destacar as alterações em fígado e rim. O 5-FU é metabolizado no fígado e inativado pela enzima dihidropirimidina desidrogenase que em algumas condições pode resultar em toxicidade hepática (LUNENBURG et al., 2016). Além disso, após ser metabolizado no fígado o 5-FU é clivado em a-fluoro-b-alanina, amônia, ureia e dióxido de carbono, levando a nefrotoxicidade (RASHID et al.). Do mesmo modo a CIS é reconhecidamente capaz de causar nefrotoxicidade (KARASAWA & STEYGER, 2015), principalmente

em razão do rim absorver a cisplatina em concentrações mais elevadas em comparação com outros tecidos (PABLA et al., 2009; FILIPSKI et al. 2009). Por outro lado, a DP pode exercer efeitos sobre o fígado por meio das bactérias patogênicas, mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo (HAN et al., 2016), e sobre a função renal pelo aumento da carga inflamatória sistêmica, ocasionando alterações na albumina sérica e níveis de proteína C-reativa (DA COSTA et al., 2015; YOSHIHARA et al., 2017). Deste modo, a DP em conjunto com os efeitos deletérios dos quimioterápicos sobre esses órgãos podem comprometer ainda mais as condições hepáticas e renais e aumentar a debilidade do paciente.

Diante da grande preocupação em elucidar detalhadamente a associação da influência dos quimioterápicos com a DP, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos quimioterápicos nos tecidos periodontais normais e sobre a evolução da PE e o efeito sinérgico dos quimioterápicos e PE sobre as funções hepáticas e renais. Portanto, no capítulo 1 foi proposto avaliar a influência dos quimioterápicos 5-FU e CIS nos tecidos periodontais normais e sobre a evolução da doença periodontal em animais portadores de periodontite experimental (PE) do ponto de vista histomorfométrico, imageológico pela análise de microtomografia computadorizada (μ CT), imunoistoquímico para detecção de TRAP, um biomarcador de osteoclastos, RANKL, um regulador positivo da reabsorção óssea; OPG, um regulador negativo da reabsorção óssea; TNF α e IL-1 β , marcadores pró-inflamatórios; PCNA, um marcador de proliferação celular; HIF-1 α regulado pela hipóxia tecidual; e BAX, o produto proteico de um oncogene pró-apoptótico. No capítulo 2 foi proposto o efeito sinérgico da PE associada aos quimioterápicos 5-FU ou CIS sobre as funções hepáticas e renais. Deste modo, as alterações no fígado foram avaliadas pelos níveis séricos das enzimas

Aspartato Aminotransferase (ALT) e da Alanina Aminotransferase (AST) e as funções renais foram avaliadas pelos níveis séricos de Creatinina e Uréia.

Referências da Introdução Geral

1. ALANI, A.; SEYMOUR, R. Systemic medication and the inflammatory cascade. **Periodontol 2000**, p. 198–210, 2014.
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. BROWN, C.G.; BECK, S.L.; PETERSON, D.E.; MCGUIRE, D.B.; DUDLEY, W.N.; MOONEY, K.H. Patterns of sore mouth in outpatients with cancer receiving chemotherapy. *Support Care Cancer*, v. 17, p. 413-28, 2009.
4. CEKICI, A.; KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000** v. 64, p. 57-80, 2014.
5. CHO, J.M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.R.; PARK, H.M.; KWAK, M.K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. **Cancer Lett.** v. 260, p. 96–108, 2008.
6. DA COSTA, T. A.; SILVA, M. J.; ALVES, P. M.; et al. Inflammation Biomarkers of Advanced Disease in Nongingival Tissues of Chronic Periodontitis Patients. **Mediators Inflamm**, 2015: 983782, 2015.
7. DEWIT, L. Combined treatment of radiation and cisdiamminedichloroplatinum (II): a review of experimental and clinical data. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** v. 13, p. 403–426, 1987.
8. DJURIC, M.; CAKIC, S.; HADZI-MIHAILOVIC, M.; PETROVIC, D.; JANKOVIC, L. Oral status in patients receiving 5-fluorouracil for colorectal cancer. **Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology** v. 15, p. 475-479, 2010.
9. DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther.* v. 18, p. 853-74, 2003.
10. EPSTEIN, J.B.; SCHUBERT, M.M. Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* v. 88, p. 273-6, 1999.
11. FERNANDES, L.A.; de ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; MARTINS, T. M.; OKAMOTO, T.; GARCIA, V.G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **J Clin Periodontol** v.36, n.3, p. 219-228, 2009.

12. FILIPSKI, K. K.; MATHIJSEN, R. H.; MIKKELSEN, T. S.; SCHINKEL, A. H.; SPARREBOOM, A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. **Clin Pharmacol Ther**, v. 86, p. 396-402, 2009.
13. GARCIA, V.G.; NOVAES, V.C.; DE ALMEIDA, J.M.; LONGO, M.; ERVOLINO, E.; BOMFIM, S.R.; THEODORO, L.H. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**. v. 23, p. 2007-2017, 2015.
14. 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 Chemotherapy and Pharmacology** v. 42, p. 77-83, 1998.
15. GUGGENHEIMER, J.; VERBIN, R.S.; APPEL, B.N.; SCHMUTZ, J. Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v. 44, p. 58-63, 1977.
16. HALF, E.; ARBER, N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. **Expert Opin Pharmacother** v.10, p. 211-219, 2009.
17. HAN P, SUN D, YANG J. Interaction between periodontitis and liver diseases. **Biomed Rep**, v. 5, p. 267-276, 2016.
18. 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 surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics** v. 106, p. 217-26, 2008.
19. KARASAWA, T.; STEYGER, P.S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicol Lett.**, v. 237, p. 219-227, 2015.
20. KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res**. v. 478, p. 23–43, 2001.
21. KNOX, J.J.; PUODZIUNAS, A.L.V.; FELD, R. Chemotherapy-induced oral mucositis. Prevention and management. **Drugs Aging**. v. 14, p. 257-67, 2000.
22. KÖBERLE, B.; TOMICIC, M.T.; USANOVA, S.; KAINA, B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. **Biochim Biophys Acta**. In press, 2010.

23. LORCH, J.H.; GOLOUBEVA, O.; HADDAD, R.I.; CULLEN, K.; SARLIS, N.; TISHLER, R.; TAN, M.; FASCIANO, J.; SAMMARTINO, D.E.; POSNER, M.R.; TAX 324 Study Group. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol.** v. 12, p. 153-9, 2011.
24. LUNENBURG, C.A.; HENRICKS, L.M.; GUCHELAAR, H.J.; SWEN, J.J.; DEENEN, M.J.; SCHELLENS, J.H.; GELDERBLOM, H. Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time. **Eur J Cancer**, v. 54, p. 40-48, 2016.
25. MAZZEO, M.A.; LINARES, J.A.; CAMPOS, M.L.; BUSAMIA, B.E.; DUBERSARSKY, C.; LAVARDA, M.; JARCHUM, G.; FINKELBERG, A.B. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. **Medicina oral, Patología oral y Cirugía bucal** v. 14, p. 108-113, 2009.
26. MCGUIRE, D.B. Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than mucositis and mouthwash. **Cancer Pract.** v. 10, p. 179-91, 2002.
27. NAIDU, M.U.; RAMANA, G.V.; RANI, P.U.; MOHAN, I.K.; SUMAN, A.; ROY, P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. **Neoplasia** v. 6, p. 423-431, 2004.
28. NASSAR, P.O.; NASSAR, C.A.; GUIMARÃES, M.R.; AQUINO, S.G.; ANDIA, D.C.; MUSCARA, M.N.; SPOLIDORIO, D.M.; ROSSA, C.JR.; SPOLIDORIO, L.C. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research** v. 44, p. 479-488, 2009.
29. NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C.L.; VAN GROENINGEN, C.J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H.M.; PETERS, G.J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of oncology** v. 15, p. 1025-1032, 2004.
30. OGAWA, K.; UENO, T.; KATO, K.; NISHITANI, H.; AKIYOSHI, K.; IWASA, S.; NAKAJIMA, T.E.; HAMAGUCHI, T.; YAMADA, Y.; HOSOKAWA, A.; SUGIYAMA, T.; SHIMADA, Y. A retrospective analysis of periodontitis during

- bevacizumab treatment in metastatic colorectal cancer patients. **Int J Clin Onc** v. 18, p. 1020-4, 2013.
31. PABLA, N.; MURPHY, R. F.; LIU, K.; DONG, Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 296, p. 505-511, 2009.
 32. PANG, S.K.; YU, C.W.; AU-YEUNG, S.C.F.; HO, Y.P. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 363, p. 235–240, 2007.
 33. RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat Rev**.v. 33, p. 9–23, 2007.
 34. 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 Metabolism** v. 302, p. 1440-1449, 2012.
 35. RASHID, S.; ALI, N.; NAFEES, S.; HASAN, S. K.; SULTANA, S. Mitigation of 5-Fluorouracil induced renal toxicity by chrysin via targeting oxidative stress and apoptosis in wistar rats. **Food Chem Toxicol**, v. 66, p. 185-193, 2014.
 36. SALTZ, L.B.; KEMENY, N.E., Adjuvant Chemotherapy of Colorectal Cancer. **Oncologist**, v. 1(1 & 2), p. 22-29, 1996.
 37. SANZ, M.; BEIGHTON, D.; CURTIS, M.A.; et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. **J Clin Periodontol**. v. 44 Suppl 18:S5-S11, 2017.
 38. SHURIN G.V., A.N., SHURIN M.R. **Cancer Therapy and Dendritic Cell Immunomodulation, in Dendritic Cells in Cancer**, M.R.S.a.R.D. Salter, Ed, Springer: NY. p. 201-216. 2009
 39. STINE, K.C.; WAHL, E.C.; LIU, L.; SKINNER, R.A.; VANDERSCHILDEN, J.; BUNN, R.C.; MONTGOMERY, C.O.; SUVA, L.J.; ARONSON, J.; BECTON, D.L.; NICHOLAS, R.W.; SWEARINGEN, C.J.; LUMPKIN, C.K. JR. Cisplatin inhibits bone healing during distraction osteogenesis. **J Orthop Res**. v. 32, p. 464-470, 2014.

40. TAYLOR, S.G. 4TH; MURTHY, A.K.; VANNETZEL, J.M.; COLIN, P.; DRAY, M.; CALDARELLI, D.D.; SHOTT, S.; VOKES, E.; SHOWEL, J.L.; HUTCHINSON, J.C.; et al. Randomized comparison of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil infusion followed by radiation versus concomitant treatment in advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol.** v. 12, p. 385-395, 1994.
41. THEODORO, L.H.; LONGO, M.; ERVOLINO, E.; DUQUE, C.; FERRO-ALVES, M.L.; ASSEM, N.Z.; LOUZADA, L.M.; GARCIA, V.G. 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.** V. 51, p. 669-680, 2016.
42. THEODORO, L.H.; LONGO, M.; NOVAES, V.C.N.; et al. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**, 2017. doi: 10.1007/s00520-017-3738-0. [Epub ahead of print]
43. TSUKAMOTO, Y.; USUI, M.; YAMAMOTO, G.; TAKAGI, Y.; TACHIKAWA, T.; YAMAMOTO, M.; NAKAMURA, M. Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. **Journal of Periodontal Research** v. 47, p. 750-757, 2012.
44. VARGAS-VILLAFUERTE, K.R.; DANTAS, F.T.; MESSORA, M.R.; et al. Preliminary Results of Non-Surgical Periodontal Treatment in Patients With Breast Cancer Undergoing Chemotherapy. **J Periodontol.**, v. 87, p. 1268-1277, 2016.
45. VERMORKEN, J.B.; PEYRADE, F.; KRAUSS, J.; MESÍA, R.; REMENAR, E.; GAULER, T.C.; et al. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). **Ann Oncol**, v. 25, p. 682-688, 2014.
46. VOZZA, I.; CALDARAZZO, V.; POLIMENI, A.; OTTOLENGHI, L. Periodontal disease and cancer patients undergoing chemotherapy. **Int Dent J.**, v. 65, p. 45-48, 2015.
47. WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov.** v. 4, p. 307-20, 2005.
48. WISNIEWSKA-JAROSINSKA, M.; SLIWINSKI, T.; KASZNICKI, J.; KACZMARCZYK, D.; KRUPA, R.; BLOCH, K.; DRZEWOSKI, J.; CHOJNACKI, J.; BLASIAK, J.; MORAWIEC-SZTANDERA, A. Cytotoxicity and

- genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells. **Molecular Biology Reports** v. 38, p. 3679-3688, 2011.
49. **World Health Organization/Cancer.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 23 de março 2017.
 50. WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chem Biol Interact.** v. 147, p. 309–318, 2004.
 51. 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. **Journal of Cellular Biochemistry** v. 99, p. 1688-1704, 2006.
 52. YOSHIHARA, A.; SUGITA, N.; IWASAKI, M.; WANG Y.; MIYAZAKI H.; YOSHIE, H.; NAKAMURA, K. Relationship between renal function and periodontal disease in community-dwelling elderly women with different genotypes. **J Clin Periodontol**, v.44. p. 484-489, 2017
 53. ZHANG, J.; LIU, L.; GONG, Y.; ZHENG, X.; YANG, M.; CUI, J.; SHEN, S. Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum(II) complexes. **Eur J Med Chem.**v. 44, p. 2322-2327, 2009.

Capítulo 1^a

***Estudo comparativo da influência da quimioterapia com 5-fluorouracil e cisplatina
na progressão da periodontite experimental.***

*Comparative study of the influence of 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy on the
progression of experimental periodontitis.*

^aManuscrito para publicação de acordo com as normas do periódico *Journal of Periodontology* – ANEXO A.

Título

Estudo comparativo da influência da quimioterapia com 5-fluorouracil e cisplatina na progressão da periodontite experimental.

Autores:

Vivian Cristina Noronha Novaes*, Juliano Milanezi de Almeida*, Valdir Gouveia Garcia*.

Autor Correspondente:

Juliano Milanezi de Almeida

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça

CEP: 16050-050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: jumilanezi@hotmail.com

Fone: (005518) 36362860

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Financiamento: FAPESP 2014/11427-8

Número de figuras: 5

Número de tabelas: 1

Número de palavras: 4907

Short Running Title: Quimioterápicos e doença periodontal

One-Sentence Summary: Quimioterápicos agravam a progressão da doença periodontal.

Palavras chaves: Quimioterápicos; doença periodontal; perda óssea alveolar

* São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba; Department of Surgery and Integrated Clinic - Division of Periodontics, SP, Brazil.

Resumo

Objetivo: Este estudo avaliou comparativamente a influência da terapia sistêmica com os quimioterápicos 5-fluotouracil (5-FU) e Cisplanina (CIS) nos tecidos periodontais saudáveis e sobre a evolução da periodontite experimental (PE). **Materiais e Métodos:** foram utilizado 90 ratos machos distribuídos em 6 grupos. Grupo SPE-SS (n = 15): animais que receberam injeções de 0,5 ml de solução salina 0.9% (SS) sem indução da PE (grupo *Sham*). Grupo PE-SS (n = 15): animais que receberam injeções s de 0,5 ml de SS e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-5FU (n = 15): animais que receberam injeções de 5-Fluorouracil (5-FU) sem indução da PE. Grupo PE-5FU (n = 15): animais que receberam injeções de 5-FU e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-CIS (n = 15): animais que receberam injeções Cisplatinas (CIS) sem indução da PE. Grupo PE-CIS (n = 15): animais que receberam injeções de CIS e indução da PE após a primeira injeção. Decorridos 07, 15 e 30 dias após a primeira injeção intraperitoneal (SS ou quimioterápicos) os animais foram eutanasiados. Foram coletadas as mandíbulas contendo os primeiros molares inferiores e processadas de acordo com as análises propostas. Para a análise de microtomografia computadorizada (μ -CT) avaliou-se a porcentagem do volume de tecido ósseo (PVTO) na região de furca. As hemimandíbulas contralaterais foram utilizadas para análises histométrica da Porcentagem de Área de Sem Osso (PASO), histológica e imunoistoquímicas na região de furca para os biomarcadores TRAP, RANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β , PCNA, BAX, e HIF-1 α . Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). **Resultado:** observou se que grupos PE-5FU e PE-CIS apresentaram maior perda óssea, maior intensidade e extensão da resposta inflamatória e menor processo de reparo frente a PE. **Conclusão:** 5-FU ou CIS, exacerbaram a severidade da periodontite, sendo que os

danos periodontais causadas pelo 5-FU foram comparativamente mais severos e extensos do que os causados pela CIS. Adicionalmente 5-FU ou CIS, não foram capazes de causar danos estrutural no periodonto saudável.

Palavras chaves: Quimioterápicos; doença periodontal; perda óssea alveolar.

ABSTRACT

Aim: This study evaluated comparatively the influence of systemic therapy with the chemotherapeutic 5-fluorouracil (5-FU) and Cisplanin (CIS) in healthy periodontal tissues and in the evolution of experimental periodontitis (EP). **Materials and Methods:** 90 male rats were distributed in 6 groups. Group SPE-SS (n = 30): animals that received injections of 0.5 ml of 0.9% saline solution (SS) without EP induction (Sham group). Group PE-SS (n = 15): animals that received injections s of 0.5 ml of SS and induction of PE after the first injection. Group SPE-5FU (n = 15): animals receiving injections of 5-Fluorouracil (5-FU) without induction of PE. Group PE-5FU (n = 15): animals receiving injections of 5-FU and induction of PE after the first injection. SPE-CIS group (n = 15): animals that received Cisplatin injections (CIS) without PE induction. PE-CIS group (n = 15): animals that received CIS injections and PE induction after the first injection. After 07, 15 and 30 days after the first intraperitoneal injection (SS or chemotherapeutic drugs) the animals were euthanized. The mandibles containing the mandibular first molars were collected and processed according to the proposed analyzes. For the analysis of computerized microtomography (μ CT), the percentage of bone tissue volume (PBTv) in the furcation region was evaluated. The contralateral hemimandibula were used for histological analyzes of the percentage of bone-free area (PBFA), histological and immunohistochemistry in the furcation region for the biomarkers TRAP, RANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β , PCNA, BAX, and HIF- 1 α . Data were submitted to statistical analysis (p <0.05). **Results:** PE-5FU and PE-SS groups showed greater bone loss, greater intensity and extension of the inflammatory response and less repair process compared to PE. **Conclusion:** 5-FU or CIS exacerbated the severity of periodontitis, and periodontal damage caused by 5-FU was

comparatively more severe and faster than those caused by CIS. Additionally 5-FU or CIS were not able to cause structural damage to the healthy periodontium.

Keywords: Chemotherapy, periodontal disease, alveolar bone loss.

1. Introdução

A periodontite é uma doença imuno-inflamatória onde os desafio microbiano induzem a resposta inflamatória do hospedeiro, que em indivíduos susceptíveis resulta na destruição dos tecidos periodontais.^{1,2} A patogênese da doença periodontal pode ser modificada tanto por fatores etiológicos locais como sistêmicos, sendo que drogas que interagem com a resposta imune do hospedeiro podem alterar sua progressão.^{3,4} Nesse sentido, quimioterápicos utilizados para o tratamento de cânceres tem despertado interesse científico devido ao seu provável potencial de alterar a patogênese da periodontite. A maioria dos quimioterápicos possuem características citotóxicas ou citostáticas, com a finalidade de promover a morte celular ou evitar o rápido crescimento e proliferação de células cancerígenas.^{5,6} Porém 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 mitótico⁶ como as células da cavidade oral, ocasionando importantes alterações sistêmicas como mucosite, infecções bucais, xerostomia e disgeusia.⁷

Adicionalmente a essas alterações, estudos clínicos têm demonstrado que a quimioterapia provocou aumento do índice gengival,^{8,9} alterações na resposta inflamatória gengival, aumento na profundidade de sondagem^{9,10} e aumento dos índices de placa e sangramento.⁹ Ogawa et al., 2012¹¹ constataram que a periodontite ocorreu com maior frequência em pacientes que receberam tratamento quimioterápico. Além disso, outros estudos concluíram que o tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes submetidos a quimioterapia para tratamento de câncer é capaz de promover

melhoras na condição periodontal,^{12,13} porém com resultados menos favoráveis comparados aos pacientes com periodontite sem câncer.¹³

Contudo é de suma importância entender o modo pelo qual os quimioterápicos atuam como fatores modificadores na etiologia e patogênese da periodontite, sendo que para entender tais mecanismos são necessários estudos experimentais que avaliem a intimidade dos tecidos periodontais sob a influência dessas drogas. Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, o 5-Fluorouracil (5-FU) e a Cisplatina (CIS) são drogas muito utilizadas devido a sua ampla atividade antineoplásica.^{14,15} O 5-FU interfere na síntese do DNA inibindo a timidilato sintase e pela incorporação de seus metabolitos no RNA e DNA.¹⁶ A CIS atua induzindo a clivagem internucleossomal da cromatina, consistente com a apoptose celular.¹⁷ Dentre os poucos estudos experimentais^{18,19,20} que avaliaram a influência do 5-FU em animais portadores de periodontite experimental (PE) foi observado que os animais que receberam aplicação sistêmica de 5-FU apresentaram uma maior destruição do osso alveolar na região de furca, maior infiltrado inflamatório e maior padrão de imunomarcção para RANKL^{18,19}, um importante mediador osteoclastogênico e atividade dos osteoclastos, demonstrando que o 5-FU foi capaz de agravar o desenvolvimento da PE. Além disso, foi observado que a influência do 5-FU interferiu negativamente no processo de reparo após tratamento mecânico convencional de raspagem e alisamento radicular (RAR)¹⁸, porém ao utilizar-se aPDT e Terapia com Laser de Baixa Intensidade (TLBI) coadjuvante à RAR observou-se uma melhora da PE nos animais submetidos ao tratamento com 5-FU.¹⁹ Entretanto, além de maiores esclarecimentos com relação a influência do 5-FU na patogênese da periodontite, existe a necessidade da avaliação e comparação da influência da CIS, outra droga

quimioterápica rotineiramente utilizadas e que dentro do nosso conhecimento não apresentam relatos na literatura.

Diante da grande preocupação em elucidar detalhadamente a influência dos quimioterápicos como fator modificador na progressão da periodontite e colaborar com a fundamentação das terapias coadjuvantes adequadas às condições estabelecidas pelos quimioterápicos, o objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente os efeitos da aplicação sistêmica dos quimioterápicos 5-FU e CIS nos tecidos periodontais saudáveis e sobre a evolução da PE. Essa avaliação foi realizada por meio de análises de μ CT do volume de tecido ósseo, histometria da área sem osso, histologia dos tecidos periodontais e imunoistoquímica para os marcadores do metabolismo ósseo RANKL, um regulador positivo da reabsorção óssea, OPG, um regulador negativo da reabsorção óssea e TRAP, um biomarcador de osteoclastos, os marcadores pro-inflamatórios IL-1 β e TNF α , além de marcadores da reparação tecidual PCNA, um marcador de proliferação celular, e HIF-1 α , um marcador de hipóxia tecidual que leva a indução de angiogênese e também está relacionado com o rápido recrutamento de osteoclastos e do marcador de apoptose BAX, o produto proteico de um oncogene pró-apoptótico.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados no presente estudo 90 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 n° 2014/00543) (Anexo A). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e segundo o guia The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010.).

2.2 Protocolo experimental

2.2.1 - Aplicação das Drogas Quimioterápicas – (CIS e 5FU)

A administração de Solução Salina a 0,9%[†], 5-Fluorouracil[‡] ou Cisplatina[§] ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de 48 horas entre elas. A primeira dose de 5-FU foi de 60 mg/kg e a segunda de 40 mg/kg de peso corporal.¹⁹ Para a Cisplatina a primeira dose foi de 5 mg/kg¹⁷ e a segunda dose de 2,5 mg/kg de peso corporal. A dose de 5-FU e CIS consistiu em uma adaptação do protocolo empregado para terapia oncológica em humanos, a qual considera a superfície corpórea para determinação da dose, determinando dessa maneira a dose para o rato.^{21,22,23}

[†] Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil

[‡] Fluorouracila, 250 mg/10 ml, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil

[§] Fauldcispla, 10 mg/10 ml, Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil

2.2.2 - Protocolo da periodontite experimental

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 70 mg/kg de peso corporal de cloridrato de cetamina** associado à 6 mg/kg de peso corporal de cloridrato de xilazina††.

Nos primeiros molares inferiores esquerdos foi executada a instalação de um fio de algodão número 24‡‡ mantido em posição sub gengival por meio de nós cirúrgicos para promover a indução da PE.^{24,25}

2.2.3 - Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos que consistiram em: Grupo SPE-SS (n = 15): animais que receberam injeções de 0,5 mL de solução salina 0.9% (SS) sem indução da PE (grupo *Sham*). Grupo PE-SS (n = 15): animais que receberam injeções de 0,5 mL de SS e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-5FU (n = 15): animais que receberam injeções de 5-Fluorouracil (5-FU) sem indução da PE. Grupo PE-5FU (n = 15): animais que receberam injeções de 5-FU e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-CIS (n = 15): animais que receberam injeções Cisplatinas (CIS) sem indução da PE. Grupo PE-CIS (n = 15): animais que receberam injeções de CIS e indução da PE após a primeira injeção.

2.2.4. Períodos experimentais e obtenção das amostras

O poder do estudo foi calculado em 80%. Os animais foram eutanasiados pela administração de uma dose letal de Tiopental§§ na dose de 150 mg/kg de peso corporal aos 7, 15 e 30 dias após aplicação da primeira dose de SS ou quimioterápicos (Anexo

** Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil

†† Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil

‡‡ Corrente Algodão n°24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil

§§ Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil

B). A mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes no plano mediano e fixada em formaldeído tamponado a 4%, por um período de 48 horas.

2.3. *Processamento Laboratorial*

2.3.1. Micro tomografia computadorizada (μ CT) da fração do volume ósseo

Após fixação as mandíbulas direita ou esquerda selecionadas de forma randômica foram lavadas em água corrente e acondicionadas em álcool a 70%. As amostras destinadas ao μ CT foram escaneadas por varredura de feixe de raio-x em um sistema de radiografia tridimensional utilizando a microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan^{***} com cortes de 18 μ m (50Kv e 500 μ).

2.3.2. Processamento Histológico

Após fixação, as hemimandíbulas contralaterais às selecionadas para μ CT foram lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de EDTA à 10%, com trocas semanais por um período médio de 8 semanas. Após processamento convencional e inclusão das amostras em parafina, cortes semi seriados (4 μ m) foram obtidos no sentido mesio-distal. Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, dois cortes equidistantes de cada espécime foram corados com hematoxilina e eosina para análise histológica e histométrica. Outros oito cortes foram submetidos ao processamento imunoistoquímico pela técnica de imunoperoxidase indireta de acordo com o protocolo descrito por Garcia et al.²⁶ Esta seleção foi realizada por um examinador experiente (JMA), treinado e cego aos tratamentos efetuados. Outros examinadores calibrados e cegos aos tratamentos efetuados realizaram as análises histológica (EE), histométrica (VCNN) e

^{***} SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003

imunoistoquímica para TRAP^{†††}, PCNA^{†††} (VCNN), RANKL^{§§§}, OPG^{****}, TNF α ^{†††}, IL-1 β ^{††††}, BAX^{§§§§}, HIF-1 α ^{*****} (EE).

2.4. Análise dos Resultados

2.4.4. Análise da μ CT

As imagens geradas pelo escaneamento foram sequencialmente reconstruídas, reorientadas espacialmente e analisadas usando um software específico^{†††††} para quantificar a porcentagem do volume de tecido ósseo (PVTO) na região da furca.²⁷ Em cada imagem, uma região específica tridimensional de interesse (ROI) foi padronizada de acordo com os seguintes critérios: Limite apical: ápice das raízes mesial e distal do primeiro molar; Limite coronal: topo da furca do primeiro molar; Limite posterior: face mesial da raiz distal do primeiro molar; Limite anterior: face distal da raiz mesial do primeiro molar; Limite vestibular: início da raiz da vestibular; Limite lingual: início da raiz lingual. A análise da PVTO foi calculada para a detecção de tecido mineralizado dentro da ROI. (Anexo C)

2.4.3. Análise histométrica

Para a determinação da Porcentagem de Área Sem Osso (PASO) na furca foi utilizada a metodologia adaptada de Garcia et al.¹⁸ para essa análise, utilizando um sistema de análise de imagem^{†††††}. Foi mensurada a área total da furca (AF) e em

^{†††} SC 30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA

^{†††} VP-P980, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA

^{§§§} SC 7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA

^{****} SC 7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA

^{††††} SC-1348, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

^{††††} SC-7884, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

^{§§§§} SC-526, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

^{*****} usc-53546, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

^{†††††} NRecon/DataViewer/CTAN;Skyscan

^{†††††} Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany

seguida a área ocupada por osso (AO), ambas em mm². Posteriormente foi calculada a PASO. 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. Foi calculado a porcentagem de osso na furca (POF) multiplicando-se AO por 100 e dividindo-se por AF ($POF = (AO \times 100) / AF$) (Anexo D). Em seguida a PASO foi calculada subtraindo a porcentagem de osso na furca (POF) de 100. A PASO de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador, calibrado e cego aos grupos experimentais em dias diferentes (VCNN).

2.4.1. Análise histológica

Um histologista certificado (EE) avaliou os seguintes parâmetros histológicos:

1) intensidade da resposta inflamatória; 2) extensão do processo inflamatório; 3) reabsorção radicular externa em cimento e dentina; 4) reabsorção óssea alveolar; 5) padrão de estruturação do tecido conjuntivo na região de furca; e 6) padrão de estruturação do tecido ósseo na região de furca.

2.4.2. Análise imunoistoquímica

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão). A imunomarcacão foi definida como aquela de coloração acastanhada presente predominantemente no compartimento citosólico das células e em menor escala à matriz extracelular (TRAP, RANKL, OPG, TNF α , IL-1 β , BAX e HIF-1 α) ou núcleo (PCNA). A imunomarcacão para RANKL, OPG, TNF α , IL-1 β , BAX e HIF-1 α foram analisadas na AF com um aumento de 400x para uma análise descritiva. A imunomarcacão para TRAP e PCNA foi avaliada pela

contagem de células TRAP-positiva e PCNA-positivas localizadas no centro do septo interradicular do primeiro molar inferior esquerdo de uma área de 1000µm x 1000µm, com um aumento de 200x.^{26,28} O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 1000µm. Foi efetuada uma análise quantitativa das células multinucleadas TRAP-positivas e PCNA-positivas. (Anexo D)

2.4.5. *Análise Estatística*

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa Bioestat 5.0^{§§§§§}. Para a calibração da mensuração da PASO e PVTO foram realizadas três mensurações as quais foram submetidas ao Teste Kappa e não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$). Os dados da PASO, PVTO, TRAP e PCNA foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, em seguida foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA) a um critério e o pós teste de Tukey. O nível de significância dos testes foi de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. *Análise da µCT*

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 1. Na análise intra grupo os grupos PE-SS, PE-5FU e PE-CIS apresentaram menor PVTO quando comparado com os grupos SPE-SS, SPE-5FU e SPE-CIS ($p \leq 0,05$) em todos os períodos, o grupo PE-5FU, apresentou uma menor PVTO aos 7 e 15 dias quando comparado aos 30 dias ($p \leq 0,01$). O grupo PE-CIS apresentou menor PVTO aos dia 7 quando comparado aos 15 e 30 dias ($p \leq 0,01$). Na análise inter grupos os grupos PE-SS e PE-CIS apresentaram

^{§§§§§} Bioestat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil

maior VTO quando comparado ao grupo PE-5FU em todos os períodos experimentais ($p \leq 0,01$). O grupo PE-CIS mostrou menor PVTO quando comparado com o grupo PE-SS aos 15 e 30 dias ($p \leq 0,01$).

3.2. *Análise da PASO*

Os resultados da análise da PASO estão apresentados na figura 2. A análise intragrupo mostrou o grupo PE-5FU apresentou maior PASO aos 15 dias quando comparado as 7 e 30 dias ($p \leq 0,01$). A análise intergrupo mostrou maior PASO nos grupos PE-SS, PE-5FU, PE-CIS quando comparados aos grupos SPE-SS, SPE-5FU e SPE-CIS ($p \leq 0,01$). O grupo PE-SS mostrou menor PASO quando comparado ao grupo PE-5FU e PE-CIS em todos os períodos experimentais ($p \leq 0,05$). O grupo PE-5FU maior PASO quando comparado ao grupo PE-CIS aos 7 e 15 dias ($p \leq 0,05$).

3.1. *Análise Histológica*

A análise histológica apresentada na Tabela 1, mostrou que em todos os períodos experimentais os grupos SPE-SS, SPE-5FU e SPE-CIS exibiram características histológicas similares entre si e condizentes com um padrão de normalidade. No grupo PE-SS um intenso infiltrado inflamatório estava presente em todo o tecido conjuntivo da região de furca aos 7 dias. A magnitude e a extensão da resposta inflamatória foi gradual e lentamente sendo reduzida aos 15 e 30 dias. Alguns espécimes apresentavam espículas de osso necrosado. O septo interradicular se mostrou com um contorno irregular e com trabéculas ósseas delgadas, com persistência de osteoclastos ativos em todos os períodos experimentais. No grupo PE-5FU e PE-CIS aos 7, 15 e 30 dias o tecido conjuntivo da área de furca apresentava um intenso infiltrado inflamatório que atingia as margens tecido ósseo do septo interradicular. Na maioria dos espécimes grandes espículas de osso necrosado estavam presentes. O tecido

ósseo do septo interradicular se mostrou composto por trabéculas ósseas muito delgadas, com amplos espaços medulares apresentando inclusive células inflamatórias. O contorno externo do septo interradicular se apresentou muito irregular, repleto de lacunas de reabsorção e osteoclastos ativos. Em alguns espécimes, especialmente aos 15 e 30 dias em PE-5FU e 30 dias em PE-CIS o nível de reabsorção óssea foi tão acentuado que eliminou por completo o septo interradicular e atingiu o osso basal da mandíbula, denotando um aumento da severidade da doença periodontal ao longo do tempo. Em PE-5FU o comprometimento periodontal foi marcadamente acelerado em comparação com PE-CIS.

3.5. Análise imunoistoquímica

Os resultados para imunomarcção dos reguladores do metabolismo ósseo TRAP, RANKL e OPG estão representados na figura 3. As células TRAP-positivas apresentavam mais de três núcleos, e foram localizadas na superfície do osso alveolar do septo inter-radicular com imunomarcção predominantemente em osteoclastos. Na análise intra-grupo, os grupos PE-5FU e PE-CIS apresentaram um maior número de células TRAP-positivas aos 7 dias em comparação com 15 e 30 dias ($p \leq 0,01$). Na análise intergrupo, o grupo PE-5FU apresentou maior número de células TRAP-positivas quando comparado com o grupo PE-SS em todos os períodos experimentais ($p \leq 0,05$) e o grupo PE-CIS apresentou maior número de células TRAP-positivas quando comparado ao grupo PE-SS aos 7 e 15 dias ($p \leq 0,05$). As imunomarcações para RANKL e OPG foram predominantemente expressa em osteoblastos e, em alguns fibroblastos no osso e tecido conjuntivo na região de furca. Na análise da RANKL, os grupos PE-5FU e PE-CIS apresentaram padrão de imunomarcção de extremamente alto a alto, enquanto que o grupo PE-SS mostrou padrão de imunomarcção de alto a

moderado, no decorrer dos períodos experimentais. Para OPG, os grupos SPE-SS e PE-SS apresentaram um padrão de imunomarcacão variou de baixo à moderado em todos os períodos experimentais. Nos grupos que receberam aplicacão de ambos quimioterápicos (5-FU ou CIS), tanto com periodonto normal quanto com periodontite experimental, o padrão de imunomarcacão para OPG se apresentou baixo em todos os períodos experimentais.

Os resultados para imunomarcacão das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β estão representados na figura 4. Para TNF α e IL-1 β os grupos SPE-5FU, SPE-CIS, PE-5FU e PE-CIS apresentaram maior padrão de imunomarcacão comparados aos grupos SPE-SS e PE-SS. No grupo PE-SS aos 7 e 15 o padrão de imunomarcacão para TNF α e IL-1 β se mostrou variando de alto à moderado, sendo que aos 30 dias prevaleceu um moderado padrão de imunomarcacão. Nos grupos PE-5FU e PE-CIS o padrão de imunomarcacão para TNF α e IL-1 β se apresentou alto aos 7, 15 e 30 dias.

Os resultados para imunomarcacão para o processo de reparacão tecidual PCNA e HIF-1 α e de apoptose BAX estão apresentados nas figura 5. A imunomarcacão para PCNA foi expressa predominantemente em células conjuntivas e da superfície do osso. Na análise intra-grupo, os grupos SPE-5FU, PE-5FU e SPE-CIS apresentaram um maior número de células PCNA-positivas aos 7 dias em comparacão com 15 e 30 dias ($p \leq 0,05$) e o grupo PE-CIS apresentou um maior número de células PCNA-positivas aos 7 dias comparado aos 30 dias ($p \leq 0,05$). Aos 15 dias os grupos PE-SS e SPE-5FU apresentaram menor número de células PCNA-positivas e o grupo PE-CIS apresentou maior número de células PCNA-positivas comparado aos 30 dias ($p \leq 0,05$). Na análise intergrupo, o grupo SPE-SS apresentou maior número de células PCNA positivas comparados aos grupos SPE-5FU e SPE-CIS em todos os períodos e menor número de células PCNA-positivas comparado ao grupo PE-SS aos 30 dias ($p \leq 0,05$). O grupo PE-

SS apresentou maior número de células PCNA positiva comparado aos grupos SPE-5FU, SPE-CIS, PE-5FU e PE-CIS em todos os períodos ($p \leq 0,05$). O grupo PE-CIS comparado ao grupo SPE-5FU apresentou maior número de células PCNA positivas aos 15 dias e menor número comparado aos 30 dias ($p \leq 0,05$). Para BAX, em todos os períodos experimentais nos grupos SPE-SS e PE-SS, o padrão de imunomarcacão se apresentou baixo, assim como, nos grupos SPE-5FU e SPE-CIS. Tanto nos grupos PE-5FU quanto no grupo PE-CIS a imunomarcacão para BAX variou de baixo à moderada aos 7, 15 e 30 dias. Para HIF-1 α todos os grupos experimentais apresentaram um baixo padrão de imunomarcacão, exceto no grupo PE-SS, que apresentou um moderado padrão de imunomarcacão em todos os períodos experimentais.

4. Discussão

Este estudo avaliou comparativamente, a influência da aplicação sistêmica dos quimioterápicos para tratamento de câncer 5-FU ou CIS nos tecidos periodontais saudáveis e durante a evolução da PE induzida em ratos. Os animais com periodonto saudável que receberam aplicação dos quimioterápicos não apresentaram alterações que resultassem em perda óssea alveolar. Por outro lado os animais portadores de PE que receberam aplicação sistêmica dos quimioterápicos 5-FU ou CIS apresentaram uma maior severidade da PE comparados ao grupo controle, sendo que os animais que receberam aplicações de 5-FU apresentaram uma severidade ainda maior da PE comparados aos animais que receberam aplicações de CIS, demonstrando uma diferença na magnitude da influência dos diferentes quimioterápicos sobre a evolução da PE.

O modelo experimental de indução da PE por ligadura em roedores é um método bastante utilizado em pesquisa²⁹, sendo que de acordo com estudos prévios foi constatado que a PE ocorre de maneira previsível após 7 dias da instalação da ligadura.^{22,30} Além disso estudos realizados em ratos com PE que foram submetidos à aplicação sistêmica de medicamentos demonstraram que este é um modelo adequado e previsível para a avaliação da influência sistêmica de drogas sobre a da PE.^{3,18-20}

No presente estudo, a PE na área de furca foi avaliada pelas análises do PVTO e da PASO. Os animais sem PE apresentaram de maneira significativa maior PVTO e menor PASO comparados aos animais portadores PE, demonstrando que o 5-FU assim como a CIS não foram capazes de promover perda óssea alveolar na região de furca na ausência da PE. Esse resultado corrobora com estudo prévio com o quimioterápico 5-FU¹⁸ e adicionalmente comprova que também a CIS na ausência de biofilme bacteriano,

isoladamente não foi capaz de promover alterações e colapso das estruturas periodontais nos períodos avaliados. Com relação aos grupos portadores de PE, ao avaliarmos os resultados do PVTO e PASO, observou-se que os animais que receberam aplicação sistêmica de ambos os quimioterápicos apresentaram maior perda óssea quando comparado ao grupo PE-SS. Sabe-se que a influência do 5-FU sobre a PE é capaz de ocasionar grande reabsorção do osso alveolar na região de furca, podendo até mesmo alcançar o osso basal.^{18,19} Além disso de acordo com nossos resultados, à despeito de ambos os quimioterápicos levarem a uma maior extensão da perda óssea alveolar, os animais que receberam aplicação de 5-FU apresentaram uma perda óssea ainda maior que os animais que receberam aplicação de CIS. Em nossos resultados imunoistoquímicos para os reguladores do metabolismo ósseo, os grupos PE-5FU e PE-CIS apresentaram de maneira significativa maior quantidade de células TRAP-positivas, assim como um maior padrão de imunomarcagem para RANKL e menor padrão de imunomarcagem para OPG quando comparados ao grupo PE-SS nos respectivos períodos. Porém, mesmo não havendo diferença significativa nas células TRAP-positivas entre os grupos PE-5FU e PE-CIS, observou-se que o grupo PE-5FU apresentou um maior número de células TRAP-positivas aos 7 dias, caracterizando uma maior atividade osteoclástica nos períodos iniciais. A remodelação óssea periodontal é regulada localmente pelo sistema RANK–RANKL–OPG, no qual o receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK), seu ligante receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL), e o fator anti-osteoclastogénico osteoprotegerina (OPG) atuam na ativação ou inibição da atividade osteoclastica^{31,32} e número de células TRAP-positivas. Em estudos prévios sobre o 5-FU os autores observaram que os animais que receberam o quimioterápico 5-FU apresentaram maior padrão de imunomarcagem para RANKL condizente com uma maior reabsorção do osso alveolar.^{18,19} Diante dos nossos

resultados observou-se que a CIS assim como o 5-FU aumenta a atividade osteoclástica via ativação do sistema RANK/RANKL influenciando na progressão da PE.

Sabe-se que as citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-1 β estimulam a produção de quimiocinas, induzem a expressão de outros mediadores inflamatórios que potencializam a resposta inflamatória e atuam como potentes indutores da reabsorção óssea.³³ Raghu Nadhanan et al.³⁴ demonstraram que o quimioterápico 5-FU induziu uma condição inflamatória, provocando aumento da expressão de TNF- α e aumento da expressão de RANK em metáfise de tíbia de ratos, o que levou ao aumento da presença de osteoclastos e da atividade de reabsorção óssea. Do mesmo modo Stine et al.³⁵, observou que a CIS promoveu um efeito negativo sobre o processo de reparo em defeitos ósseos em tíbias de rato. Em nossos resultados os grupos PE-5FU e PE-CIS apresentaram uma maior exacerbação do processo inflamatório comparado ao grupo PE-SS, o qual atingia as margens tecido ósseo do septo interradicular, intensificando a reabsorção óssea e denotando um aumento da severidade da doença periodontal no decorrer dos períodos nos animais que receberam aplicação sistêmica dos quimioterápicos, caracterizando uma intensificação da inflamação por um maior período de tempo, denotando uma inflamação exacerbada e persistente. O mesmo resultado foi encontrado em estudos prévios que avaliaram o 5-FU associado à PE.¹⁸⁻²⁰ Além do mais, no presente estudo foi observado que o comprometimento periodontal foi marcadamente mais acelerado nos animais do grupo PE-5FU em comparação com o grupo PE-CIS. Corroborando com a análise histológica, os nossos resultados para imunomarcação das citocinas pró-inflamatórias demonstraram que enquanto no grupo PE-SS houve uma redução no padrão de imunomarcação de TNF- α e IL-1 β no decorrer dos períodos, nos grupos PE-5FU e PE-CIS prevaleceu um alto padrão de imunomarcação em todos os períodos experimentais. Tal resultado aliado aos achados

histológicos demonstram que os quimioterápicos além de intensificam e aumentam a duração da resposta inflamatória causada pela PE nos tecidos periodontais. Portanto podemos afirmar que frente a exacerbação da resposta inflamatória houve uma maior destruição do osso alveolar, tendo em vista que as citocinas TNF- α e IL-1 β quando produzidas em quantidade excessiva podem induzir mecanismos inflamatórios que resultam em reabsorção óssea, inibição da síntese do colágeno e ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), causando a destruição do tecido conjuntivo e do tecido ósseo.³⁶⁻³⁸ Sabe-se que o 5-FU e CIS induzem o aumento de citocinas pró-inflamatórias em mucosa intestinal³⁹, mucosa oral⁴⁰ e rim.⁴¹ Em estudo realizado por Hamouda et al.³⁹ observou-se que o 5-FU aumentou a expressão de TNF- α e IL-1 β em mucosa intestinal, sendo que a expressão aumentada de TNF- α foi associada diretamente a apoptose e supressão da proliferação de células intestinais, resultando em degradação da barreira epitelial e inflamação secundária mediada por citocinas inflamatórias. Desse modo, podemos afirmar que ambos os quimioterápicos podem ser capazes de aumentar a expressão de TNF- α e IL-1 β nos tecidos periodontais, sendo que na presença de PE irá levar a exacerbação do processo inflamatório.

O 5-FU e a CIS possuem ação celular anti proliferativa e apoptótica.^{6,42,43} O PCNA, ou antígeno nuclear de células em proliferação é uma proteína nuclear ligada à replicação de DNA encontrada em células que sofrem divisão, tendo uma função na iniciação da proliferação celular por aumento da enzima DNA-polimerase.⁴⁴ A BAX é um regulador pró-apoptótico que se liga à BCL-2 levando a morte celular.⁴⁵ Em nossos resultados ao compararmos os grupos SPE-5FU e SPE-CIS com o grupo SPE-SS, os animais que receberam aplicação sistêmica de ambos os quimioterápicos apresentaram de maneira significativa um menor número de células PCNA-positivas. Desse modo, diante de tal diferença encontrada entre os grupos SPE-5FU e SPE-CIS comparados ao

SPE-SS, podemos inferir que mesmo não sendo encontradas alterações no periodonto saudável no presente estudo, os quimioterápicos 5-FU ou CIS afetaram negativamente a capacidade de renovação celular no periodonto saudável, o que poderia acarretar danos futuros mesmo na ausência da doença periodontal. Além disso foi observado que nos grupos PE-5FU e PE-CIS a imunomarcagem para BAX foi maior que no grupo PE-SS. Com relação a análise de PCNA nos animais portadores de PE, esta demonstrou que nos grupos que receberam aplicação de ambos os quimioterápicos, as células PCNA-positivas sofreram significativa diminuição ao longo dos períodos experimentais, denotando uma influência progressiva dos quimioterápicos no decorrer dos períodos. Deste modo ao correlacionarmos uma menor quantidade de células PCNA-positivas e um maior padrão de imunomarcagem para BAX nos grupos PE-5FU e PE-CIS quando comparados ao grupo PE-SS, é possível inferir que os quimioterápicos influenciaram na patogênese da PE interferindo no “turnover” celular e processo de reparo tanto pela diminuição da proliferação celular quanto pelo aumento da apoptose, corroborando com dados de estudos que comprovam o efeito negativo da quimioterapia no processo de reparo tecidual.^{18,19,35,46} O nosso estudo também se propôs a avaliar a HIF-1 α , que é um fator de marcação de hipóxia tecidual⁴⁷ e da mesma forma avalia o processo de reparo tecidual. A hipóxia é considerada um estímulo para angiogênese através da ativação da HIF-1 α .^{48,49} O HIF-1 α aumenta a expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que regula a formação de vasos sanguíneos, sendo um fator dependente para o processo de reparo.⁴⁸ Em nossos resultados para marcação de HIF-1 α apenas o grupo PE-SS apresentou moderado padrão de imunomarcagem, enquanto os demais apresentaram baixo padrão, portanto o resultado do presente estudo demonstrou que na presença da PE ambos os quimioterápicos podem afetar o processo de reparo, diminuindo o estímulo para formação vascular nos animais portadores de PE.

Tendo em vista que a etiologia da doença periodontal pode ser modificada pela resposta imunológica individual do hospedeiro,^{37,50} estabelecer de que modo os quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer alteram o curso da doença é determinante para a elaboração e aprimoramento de abordagens terapêuticas para o tratamento da periodontite. Em nosso estudo foi observado que ambos os quimioterápicos 5-FU e CIS contribuíram para o agravamento da evolução da PE por duas vias: aumentando a intensidade e duração do processo inflamatório; e diminuindo a capacidade de reparo tecidual por redução do “turnover” celular e vascular. Quando o processo inflamatório é prolongado por uma condição sistêmica, ocorre o atraso na fase de formação óssea, reduzindo significativamente a capacidade de formação óssea reparativa.³⁷ Além do que, a angiogênese é fator determinante para o processo de reparo ósseo.⁴⁸ Desta forma, a influência dos quimioterápicos 5-FU e CIS na evolução da PE resultou de forma significativa maior perda óssea, que comparativamente foi maior nos animais que receberam aplicação sistêmica de 5-FU do que de CIS.

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, podemos concluir que ambos os quimioterápicos, 5-FU ou CIS, exacerbaram a severidade da periodontite, sendo que os danos periodontais causadas pelo 5-FU foram comparativamente mais severos e mais rápido do que os causados pela CIS. Além do mais, ambos os quimioterápicos, 5-FU ou CIS, não foram capazes de causar alterações teciduais que resultassem em perda óssea no periodonto saudável.

Agradecimentos

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP,

Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, São Paulo. À CAPES pela concessão de bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2014/11427-8).

Referências Bibliográficas

1. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017;44 Suppl 18:S5-S11.
2. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64:57-80.
3. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2009;44:479-488.
4. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*. 2009;36:219-228.
5. Guchelaar HJ, Vermes I, Koopmans RP, et al. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1998;42:77-83.
6. Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. *Molecules*. 2008;13:2340-2369.
7. Wong HM. Oral complications and management strategies for patients undergoing cancer therapy. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:581795.

8. Jensen SB, Mouridsen HT, Bergmann OJ, et al. Oral mucosal lesions, microbial changes, and taste disturbances induced by adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics*. 2008;106:217-26.
9. Djuric M, Cakic S, Hadzi-mihailovic M, et al. Oral status in patients receiving 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology* 2010;15:475-479.
10. Mazzeo MA, Linares JA, Campos ML, et al. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Medicina oral, Patología oral y Cirugía bucal* 2009;14:108-113.
11. Ogawa K, Ueno T, Kato K, et al. A retrospective analysis of periodontitis during bevacizumab treatment in metastatic colorectal cancer patients. *Int J Clin Onc* 2013;18:1020-1024.
12. Vozza I, Caldarazzo V, Polimeni A, et al. Periodontal disease and cancer patients undergoing chemotherapy. *Int Dent J*.2015;65:45-48.
13. Vargas-Villafuerte KR, Dantas FT, Messoria MR, et al. Preliminary Results of Non-Surgical Periodontal Treatment in Patients With Breast Cancer Undergoing Chemotherapy. *J Periodontol*.2016;87:1268-1277.
14. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, et al. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12: 153-159.
15. Vermorken JB, Peyrade F, Krauss J, et al. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous

- cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Ann Oncol*. 2014;25:682-688.
16. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:330-338.
 17. Havelka AM, Berndtsson M, Olofsson MH, et al. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2007;7:1035-1039.
 18. Garcia VG, Novaes VC, De Almeida JM, et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. 2015;23:2007-2017.
 19. Theodoro LH, Longo M, Ervolino E, et al. 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;51:669-680.
 20. Theodoro LH, Longo M, Novaes VCN, et al. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. 2017;doi: 10.1007/s00520-017-3738-0. [Epub ahead of print]
 21. Johnson JH. Effects of local irritation and dextran and sulphat administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research* 1975;10:332-345.
 22. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, et al. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology* 2007;78:566-575.
 23. Du Bois D & Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Nutrition* 1989;17:303-311.

24. Nakasato T, Izumisawa M, Akahane A, et al. Combined intra-arterial infusion and systemic chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Japanese Journal of Radiology* 2012;30:752-761.
25. Food and Drug Administration. Dose Calculator. Conversion Chemotherapy of Human to Animals. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
26. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* 2013;84:556-565.
27. Park C.H, Abramson ZR, Taba M JR, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol*. 2007;78:273-281.
28. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2014;49:584-94.
29. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol* 2014;85:465-477.
30. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Lowdose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Brazilian journal of medical and biological research* 2002;35:613-616.
31. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79:1569-1576.

32. Sojod B, Chateau D, Mueller CG, et al. RANK/RANKL/OPG Signalization Implication in Periodontitis: New Evidence from a RANK Transgenic Mouse Model. *Front Physiol.* 2017;24:8:338.
33. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
34. Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW, et al. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E1440-9.
35. Stine KC, Wahl EC, Liu L, et al. Cisplatin inhibits bone healing during distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 2014;32:464-470.
36. Graves, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* 2008;79:1585–1591.
37. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 2011;90:143-153.
38. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J. Clin. Periodontol* 2011;38:60-84.
39. Hamouda N, Sano T, Oikawa Y, et al. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017; doi: 10.1111/bcpt.12793. [Epub ahead of print]

40. de Araújo AA, Varela H, de Medeiros CA, et al. Azilsartan reduced TNF- α and IL-1 β levels, increased IL-10 levels and upregulated VEGF, FGF, KGF, and TGF- α in an oral mucositis model. *PLoS One*.2015;17;10:e0116799.
41. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*.2010;2:2490-2518.
42. Wisniewska-Jarosinska M, Sliwinski T, Kasznicki J, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells. *Molecular Biology Reports* 2011;38:3679-3688,.
43. Cho JM, Manandhar S, Lee HR, et al. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. *Cancer Lett*. 2008;260:96–108.
44. Mailand N, Gibbs-Seymour I, Bekker-Jensen S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14:269-82.
45. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*. 2014;19:555-566.
46. Al-Mahalawy H, Marei HF, Abuhashish H, et al. Effects of cisplatin chemotherapy on the osseointegration of titanium implants. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44:337-346.
47. Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor--HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem*. 2012;19:90-97.
48. Wang Y, Wan C, Deng L, et al.; The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 2007;117:1616–1626.

49. Schmidt-Bleek K, Schell H, Lienau J, et al. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014;8:120-130.
50. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010;89:1349-1363.

Tabela 1: Porcentagem de espécimes por escore dos dados da Análise Histológica da região de furca do primeiro molar inferior de acordo com cada grupo e período.

ANÁLISE HISTOLÓGICA																					
PARAMETROS E SEUS RESPECTIVOS ESCORES				PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES POR ESCORE																	
				SPE-SS			SPE-5FU			SPE-CIS			PE-SS			PE-5FU			PE-CIS		
				7	15	30	7	15	30	7	15	30	7	15	30	7	15	30	7	15	30
PERIODOS (Dias)																					
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL																					
(1) ausência de inflamação				100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	
(2) pequena quantidade de células inflamatórias				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(3) moderada quantidade de células inflamatórias				0	0	0	0	0	0	0	0	0	60%	100%	0	0	0	0	0	0	
(4) grande quantidade de células inflamatórias				0	0	0	0	0	0	0	0	100%	40%	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO																					
(1) ausência de inflamação				100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca				0	0	0	0	0	0	0	0	60%	100%	0	0	0	0	0	0	0	
(4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca				0	0	0	0	0	0	0	100%	40%	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
REABSORÇÃO RADCLULAR EXTERNA (CEMETO E DENTINA)																					
(1) ausente				100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(2) apenas áreas reabsorvidas inativas				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(3) poucas áreas de reabsorção ativas				0	0	0	0	0	0	0	0	80%	60%	60%	20%	20%	0	40%	20%	20%	
(4) muitas áreas de reabsorção ativas				0	0	0	0	0	0	0	0	20%	40%	40%	80%	80%	100%	60%	80%	80%	
REABSORÇÃO DO OSSO ALVEOLAR																					
(1) dentro dos padrões de normalidade				100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(2) pequena quantidade de áreas de reabsorção				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(3) moderada quantidade de áreas de reabsorção				0	0	0	0	0	0	0	0	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	
(4) grande quantidade de áreas de reabsorção				0	0	0	0	0	0	0	100%	0	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO NA REGIÃO DE FURCA																					
(1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)				100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas e edema intersticial				0	0	0	0	0	0	0	0	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	
(4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose				0	0	0	0	0	0	0	100%	0	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO NA REGIÃO DE FURCA																					
(1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea				100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(2) trabéculas ósseas de contorno irregular recobertas tanto por muitos osteoblastos quanto por osteoclastos ativos				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos				0	0	0	0	0	0	0	0	20%	40%	40%	0	0	0	0	0	0	
(4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos				0	0	0	0	0	0	0	80%	60%	60%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

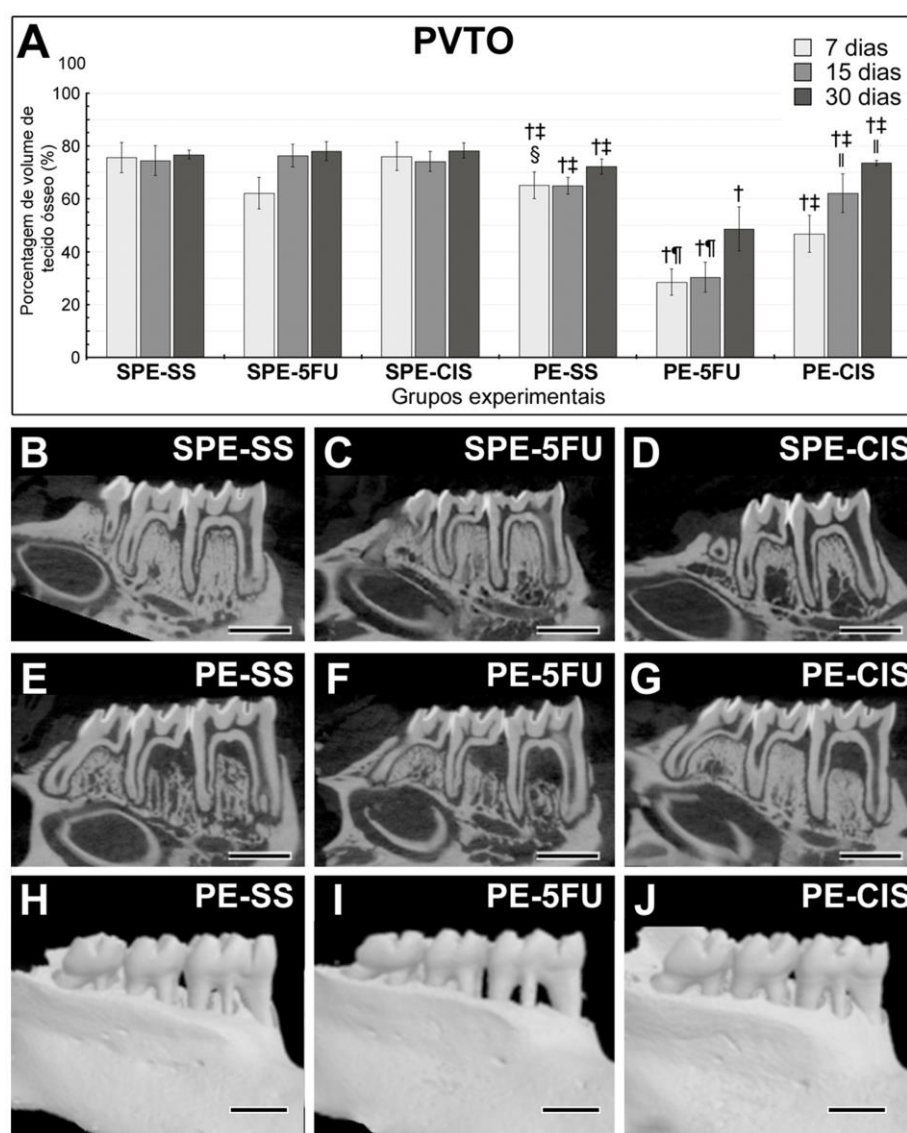


Fig. 1: A: Gráfico mostrando média e desvio padrão da PVTO na região de furca do primeiro molar inferior. Abreviações: ¶ diferença estatisticamente significativa aos 30 dias no mesmo grupo; | diferença estatisticamente significativa aos 7 dias no mesmo grupo; † diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE para o mesmo período; ‡ Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-5FU para o mesmo período; § Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-CIS para o mesmo período; (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p=0,05$). B-D: Imagens da μ CT para análise volumétrica da área de furca do primeiro molar inferior usando o plano sagital dos grupos SPE-SS, SPE-5FU e SPE-CIS aos 7 dias. E-G: Imagens da μ CT para análise volumétrica da área de furca do primeiro molar inferior usando o plano sagital dos grupos PE-SS, PE-5FU e PE-CIS aos 7 dias. Observar menor preenchimento ósseo na área de furca nos animais que receberam 5-FU ou CIS. H-J: Imagem tridimensional gerada pelo software dos grupos PE-SS, PE-5FU e PE-CIS aos 30 dias.

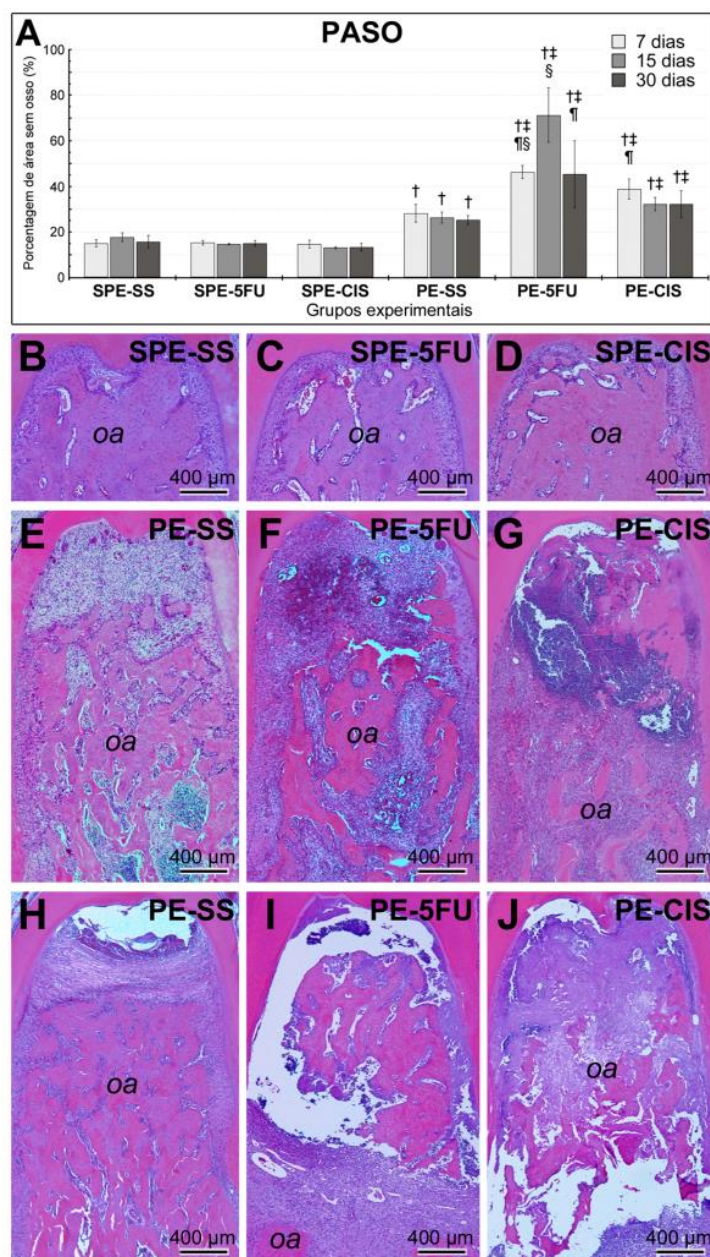


Fig. 2: A: Gráfico mostrando média e desvio padrão da PASO na região de furca do primeiro molar inferior. Abreviações: † Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 15 dias. ‡ Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE nos mesmos períodos. ‡ Diferença estatisticamente significativa com PE-SS nos mesmos períodos. § Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p < 0,05$). B-D: Fotomicrografia mostrando o efeito da quimioterapia em tecido periodontal saudável. Periodonto da região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (B) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (C) ou CIS (D). E-J: Fotomicrografias mostrando o efeito da quimioterapia na progressão da periodontite experimental. Características histológicas da região de furca do primeiro molar inferior de ratos portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia após 7 e 30 dias (E / H). Características histológicas da região de furca de ratos portadores de PE e que foram submetidos a quimioterapia com 5-FU (F / I) e CIS (G / J) após 7 e 30 dias. Abreviatura: oa osso alveolar. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Ampliação original: x50. Barras de escala: 400 µm.

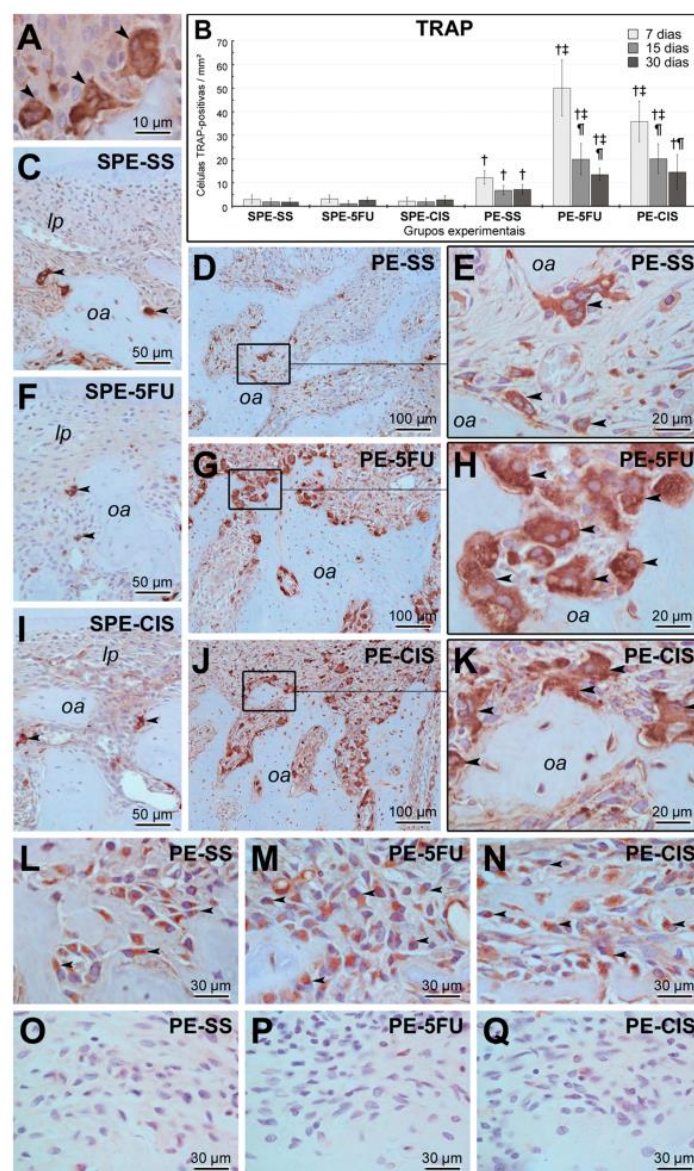


Fig 3: A: Padrão de imunomarcção para TRAP no osso alveolar da região de furca do primeiro molar inferior em ratos. B: Gráfico mostrando média e desvio padrão das células TRAP positivas em cada grupo e período. Abreviações: † Diferença estatisticamente significativa com 7 dias no mesmo grupo; ‡ Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE no mesmo período; †† Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-SS no mesmo período. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p = 0,05$). C-K: Padrão de imunomarcção de células TRAP positivas no osso alveolar aos 7 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia. L-M: Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para células RANKL positivas no osso alveolar aos 7 dias. O-P: Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para células OPG positivas no osso alveolar aos 30 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (C) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (F) ou CIS (I). Região de furca do primeiro molar inferior de ratos portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia (D, E, L, O) e ratos portadores de PE e que foram submetidos a quimioterapia com 5-FU (G, H, M, P) ou CIS (J, K, N, Q). Setas pretas: células TRAP positivas (A-K), células RANKL positivas (L-M). Abreviatura: oa osso alveolar; lp ligamento periodontal. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Ampliação original: C, F e I 200x; D, G e J 400x; A, E, H, K-Q 1000x. Barras de escala: A, 10 μ m; E, H e K, 20 μ m; L-K, 30 μ m; C, F e I, 50 μ m; D, G e J, 100 μ m.

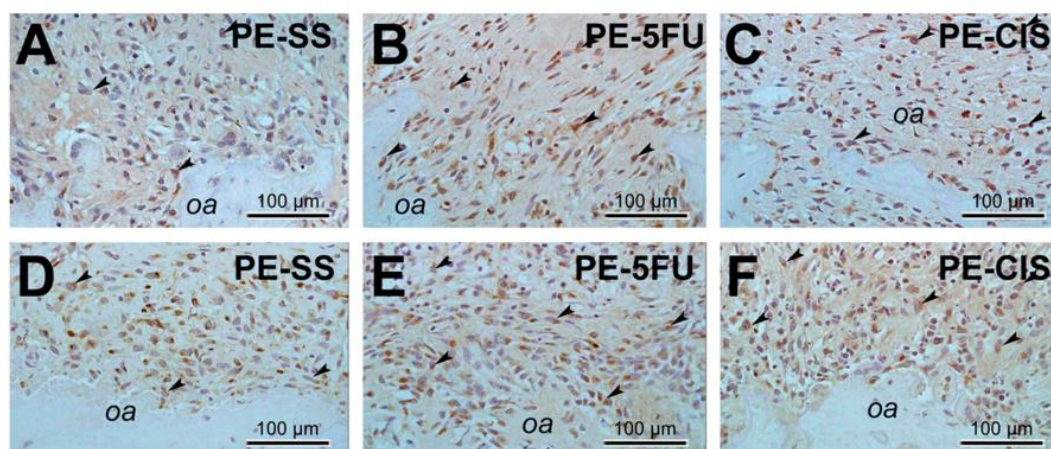


Fig. 4: A-C: Fotomicrografia mostrando padrão de imunomarcção para TNF α na região de furca aos 30 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (A) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (B) ou CIS (C). D-F: Fotomicrografia mostrando padrão de imunomarcção para IL-1 β na região de furca aos 15 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos que não foram submetidos à quimioterapia (A) ou submetidos a quimioterapia com 5-FU (B) ou CIS (C). Setas pretas: TNF α (A-C), IL-1 β (D-F). Abreviatura: oa osso alveolar. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Ampliação original: 1000x. Barras de escala: 100 μ m.

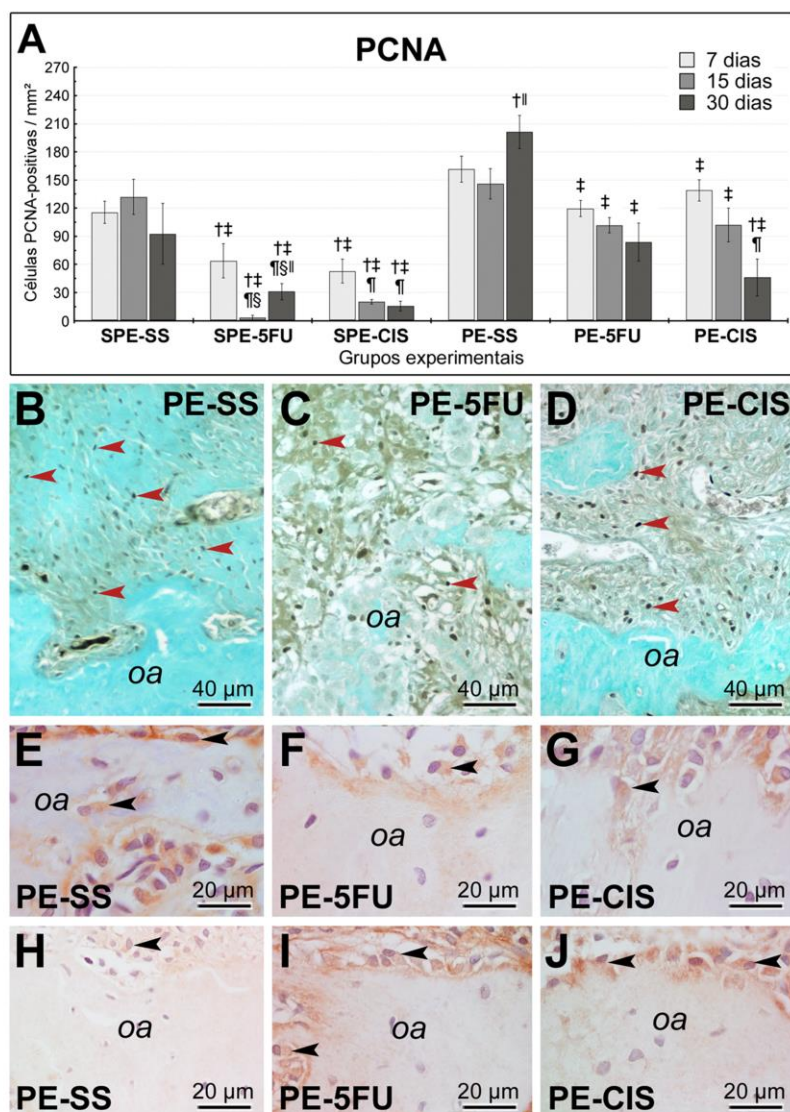


Fig. 5: A: Gráfico mostrando média e desvio padrão das células PCNA positivas em cada grupo e período. Abreviações: ¶ Diferença estatisticamente significativa com 7 dias no mesmo grupo; || Diferença estatisticamente significativa com 15 dias no mesmo grupo; † diferença estatisticamente significativa com o grupo SPE-SS no mesmo período; ‡ Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-SS no mesmo período; § Diferença estatisticamente significativa com o grupo SPE-CIS para o mesmo período. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p = 0,05$). B-D: Padrão de imunomarcacão de células PCNA positivas no osso alveolar aos 7 dias. E-G: Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcacão para células HIF-1 α positivas no osso alveolar aos 15 dias. H-J: Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcacão para células BAX positivas no osso alveolar aos 15 dias. Região de furca do primeiro molar inferior de ratos portadores de PE e que não foram submetidos a quimioterapia (B, E, H) e ratos portadores de PE e que foram submetidos a quimioterapia com 5-FU (C, F, I) ou CIS (D, G, J). Setas azuis: células PCNA positivas, setas pretas: células HIF-1 α positivas (E-G), células BAX positivas (H-J). Abreviatura: oa osso alveolar. Contra-coloração: Fast green (B-D), hematoxilina de Harris (E-J). Ampliação original: B-D 400x; E-J 1000x. Barras de escala: B-D, 40 μ m; E-J, 20 μ m.

Capítulo 2^b

*Relação entre a periodontite experimental e drogas quimioterápicas nos danos
hepáticos e renais em ratos*

*Relation between experimental periodontitis and chemotherapy drugs in hepatic and
renal damage in rats*

^bManuscrito para publicação de acordo com as normas do periódico *Supportive Care in Cancer* – ANEXO G.

Título

Relação entre a periodontite experimental e drogas quimioterápicas nos danos hepáticos e renais em ratos

Autores:

Vivian Cristina Noronha Novaes¹, Juliano Milanezi de Almeida¹, Valdir Gouveia Garcia¹.

Autor Correspondente:

Juliano Milanezi de Almeida

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça

CEP: 16050-050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: jumilanezi@hotmail.com

Fone: (005518) 36362860

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Financiamento: FAPESP 2014/11427-8

Número de figuras: 6

Número de palavras: 3959

Short Running Title: Funções renais e hepáticas, doença periodontal e quimioterápicos

One-Sentence Summary: Funções renais e hepáticas são prejudicadas pela associação da periodontite experimental e quimioterápicos.

Palavras chaves: Quimioterápicos; doença periodontal; rim; fígado.

¹ São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba; Department of Surgery and Integrated Clinic - Division of Periodontics, SP, Brazil.

Resumo

Objetivo: Este estudo avaliou a relação entre a periodontite experimental (PE) e os quimioterápicos 5-fluorouracil (5-FU) ou Cisplanina (CIS) sobre o agravamento das funções renais e hepáticas de ratos.

Materiais e Métodos: foram utilizado 60 ratos machos distribuídos em 6 grupos. Grupo SPE-SS (n = 10): animais que receberam injeções de 0,5 mL de solução salina 0.9% (SS) sem indução da PE (grupo *Sham*). Grupo PE-SS (n = 10): animais que receberam injeções s de 0,5 mL de SS e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-5FU (n=10): animais que receberam injeções de 5-FU sem indução da PE. Grupo PE-5FU (n = 10): animais que receberam injeções de 5-FU e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-CIS (n = 10): animais que receberam injeções de CIS sem indução da PE. Grupo PE-CIS (n = 10): animais que receberam injeções de CIS e indução da PE após a primeira injeção. Para as análises hematologia e bioquímicas foi realizada coleta sanguínea por punção cardíaca previamente a aplicação dos quimioterápicos ou SS (baseline) e aos 07 e 30 dias após a primeira injeção intraperitoneal. Os animais foram eutanaziados aos 07 e 30 dias e as mandíbulas foram coletadas e processadas para análise fotométrica da perda óssea alveolar (POA) ao redor do primeiro molar inferior. O sangue coletado foi dividido em dois microtubos, sendo um destinado ao exame hematológico e outro destinado às análises bioquímicas de alamina aminotrasferase (ALT), aspartato aminotrasferase (AST), Creatinina e Uréia. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$).

Resultado: os animais que receberam aplicação sistêmica de 5-FU apresentaram maior POA comparados aos grupos PE-SS e PE-CIS. A PE em conjunto ao 5-FU apresentou

de maneira significativa maiores níveis de ALT e AST aos 30 dias e em conjunto com a CIS apresentou de maneira significativa maiores níveis de Uréia e não apresentou diferença significativa nos níveis de Creatinina.

Conclusão: a PE agravou as alterações hepáticas ocasionadas pelo 5-FU na avaliação de ALT e AST e agravou as alterações renais ocasionadas pela CIS apenas na avaliação de Uréia.

Palavras chaves: Quimioterápicos; periodontite experimental; fígado, rim.

Abstract

Objective: This study evaluated the relationship between experimental periodontitis (EP) and the chemotherapy drugs 5-fluorouracil (5-FU) or cisplatin (CIS) on the aggravation of renal and hepatic functions of rats.

Materials and Methods: Sixty male rats were distributed in 6 groups. SPE-SS group (n = 10): animals receiving injections of 0.5 ml of 0.9% saline solution (SS) without EP induction (Sham group). Group PE-SS (n = 10): animals that received injections of 0.5 ml of SS and induction of EP after the first injection. SPE-5FU group (n = 10): animals that received 5-FU injections without EP induction. Group PE-5FU (n = 10): animals that received 5-FU injections and EP induction after the first injection. SPE-CIS group (n = 10): animals that received CIS injections without EP induction. PE-CIS group (n = 10): animals that received CIS injections and EP induction after the first injection. Hematological and biochemical analyzes were performed by cardiac puncture before the application of chemotherapy drugs or SS (baseline), and at 7 and 30 days after the first intraperitoneal injection. The animals were euthanized at 7 and 30 days and the jaws were collected and processed for photometric analysis of alveolar bone loss (ABL) around the first lower molar. The blood collected was divided into two microtubes, one for haematological examination and another for biochemical analysis of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine and urea. Data were submitted to statistical analysis ($p < 0.05$).

Results: Animals that received a 5-FU systemic application had higher POA compared to PE-SS and PE-CIS groups. EP together with 5-FU showed significantly higher levels of ALT and AST at 30 days and together with CIS showed significantly higher levels of Urea but did not present significant difference in creatinine levels.

Conclusion: EP worsened hepatic changes caused by 5-FU in the evaluation of ALT and AST and worsened the renal changes caused by CIS only in the urea evaluation.

Keywords: Chemotherapy; experimental periodontitis; liver, kidney.

1. Introdução

Avaliar a relação entre as condições gerais de saúde do paciente, diagnosticar infecções preexistentes e minimizar os efeitos colaterais sistêmicos ocasionados pelo tratamento oncológico nos pacientes é uma busca constante para que se elabore adequadas terapias de suporte aos protocolos terapêuticos oncológicos estabelecidos. A OMS estima que o aparecimento anual de novos casos de câncer irá aumentar dos 14 milhões registrados em 2012 para 22 milhões dentro das próximas duas décadas [1]. O tratamento convencional para o câncer é baseado, atualmente, em três importantes modalidades: cirurgia, radioterapia e quimioterapia citotóxica. A retirada cirúrgica de um tumor primário é um tratamento necessário e efetivo para um grande número de tipos de câncer [2]. Já a terapia com quimioterapia citotóxica se baseia na administração de uma dose máxima tolerável das drogas escolhidas, com o objetivo de promover a erradicação do maior número de células tumorais. O principal problema da quimioterapia está relacionado à toxicidade aguda e acumulada para os tecidos normais, como as células do sistema imune, tecidos hepáticos [3,4] e renais [5]. Assim, a quimioterapia convencional está comumente associada com uma variedade de efeitos colaterais, inclusive mielossupressão e diminuição da viabilidade e número de células dendríticas [6].

Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, o 5-Fluorouracil (5-FU) e a Cisplatina (CIS) são drogas amplamente utilizadas durante a quimioterapia [7,8], sendo que a CIS também pode ser utilizada durante a radioterapia

em razão do seu potencial radiosensibilizador [9]. A CIS é um composto com ampla atividade antineoplásica, sendo utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, dentre os quais os de testículo, pulmão, ovário, esôfago, cabeça e pescoço, mama e o carcinoma de bexiga [10,11]. Com relação ao 5-FU, este é um antimetabólito do tipo análogo da pirimidina, com amplo espectro de ação contra tumores sólidos de cabeça e pescoço, trato gastrointestinal, ovário, fígado, cérebro e mama [12]. Após sua entrada na célula, o 5-FU interfere com o metabolismo dos nucleosídeos e é incorporado a todas as classes de RNA por meio da RNA-polimerase. Adicionalmente, o fluorouracil impede a síntese de timidilato, que é um precursor necessário do DNA. A ação do 5-FU sobre o DNA e o RNA promove a toxicidade e morte celular [12,13].

A frequência e severidade das condições debilitantes do paciente frente ao tratamento com quimioterapia depende de muitos fatores associados ao paciente e à terapia antineoplásica, como o regime, droga utilizada, susceptibilidade e condição sistêmica do indivíduo. Além disso, as drogas quimioterápicas levam alterações significativas em diferentes órgãos, podendo se destacar as alterações em fígado e rim [14-17]. O 5-FU é metabolizado no fígado e inativado pela enzima dihidropirimidina desidrogenase que em algumas condições pode resultar em toxicidade hepática [14]. Além disso, após ser metabolizado no fígado o 5-FU é clivado em a-fluoro-b-alanina, amônia, ureia e dióxido de carbono, levando a nefrotoxicidade [15]. Com relação a CIS, esta é reconhecidamente capaz de causar nefrotoxicidade [16], principalmente em razão do rim absorver a cisplatina em concentrações mais elevadas em comparação com outros tecidos [17].

A Doença Periodontal (DP) é uma doença oral altamente prevalente, onde segundo os atuais dados do *National Health and Nutrition Examination Survey*

(NHANES), nos Estados Unidos a DP afeta quase 50% dos adultos acima de 30 anos [18]. A DP é uma doença imuno inflamatória onde os desafios microbianos induzem a resposta inflamatória do hospedeiro, que em indivíduos susceptíveis resulta na destruição dos tecidos periodontais [19]. Além dos danos causados localmente à saúde bucal, a DP pode influenciar de forma sistêmica por meio da translocação de bactérias patogênicas e mediadores inflamatórios que levam à uma inflamação sistêmicas [20]. Assim, sabe-se que os mecanismos infecciosos e inflamatórios relacionados à DP [20] são capazes de alterar diversas condições sistêmicas, entre elas as doenças renais crônicas e doenças hepáticas [21,22]. Nesse contexto, sabe-se que a DP pode exercer efeitos deletérios sobre o fígado por meio das bactérias patogênicas, mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo [22] e sobre os rins pelo aumento da carga inflamatória sistêmica, que altera a albumina sérica e níveis de proteína C-reativa (PCR) [23,24]. Deste modo, a DP associada aos efeitos deletérios dos quimioterápicos poderia agravar ainda mais as condições hepáticas e renais e aumentar a debilidade do paciente, aumentando a severidade dos efeitos colaterais do protocolo terapêutico para o tratamento do câncer.

Em nosso conhecimento não existe na literatura estudos clínicos ou experimentais que avalie a associação da DP e dos quimioterápicos 5-FU e CIS sobre as funções hepáticas e renais. Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da Periodontite Experimental (PE) sobre as funções hepáticas e renais de ratos submetidos ao tratamento sistêmico com os quimioterápicos com 5-FU ou CIS. Assim, as alterações no fígado foram avaliadas pelos níveis séricos das enzimas Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), que avaliam os

danos a membrana dos hepatócitos e as funções renais foram avaliadas pelos níveis séricos de Creatinina e Ureia, que avaliam a Taxa de Filtração Glomerular (TFG).

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados no presente estudo 60 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 2014/00543) (Anexo A). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e segundo o guia The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010.).

2.2 Protocolo experimental e análise dos resultados

2.2.1. Aplicação das Drogas Quimioterápicas – (CIS e 5-FU)

A administração de Solução Salina a 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), 5-FU (Fluorouracila, 250 mg/10 mL, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) ou CIS (Fauldcispla, 10 mg/10 mL, Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de 48 horas entre elas. A primeira dose de 5-FU foi de 60 mg/kg e a segunda de 40 mg/kg de peso corporal [25]. Para a CIS a primeira dose foi de 5 mg/kg [26] e a segunda dose de 2,5 mg/kg de peso corporal. A dose de 5-FU e CIS consistiu em uma adaptação do protocolo empregado para terapia oncológica em humanos, a qual

considera a superfície corpórea para determinação da dose, determinando dessa maneira a dose para o rato [27, 28].

2.2.2. *Protocolo da periodontite experimental*

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 70 mg/kg de peso corporal de cloridrato de cetamina associado à 6 mg/kg de peso corporal de cloridrato de xilazina (Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil).

Nos primeiros molares inferiores esquerdos foi executada a instalação de um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão n°24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) mantido em posição sub gengival por meio de nós cirúrgicos para promover a indução da PE [29].

2.2.3. *Grupos Experimentais*

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos que consistiram em: Grupo SPE-SS (n = 10): animais que receberam injeções de 0,5 mL de solução salina 0,9% (SS) sem indução da PE (grupo *Sham*). Grupo PE-SS (n = 10): animais que receberam injeções de 0,5 mL de SS e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-5FU (n=10): animais que receberam injeções de 5-FU sem indução da PE. Grupo PE-5FU (n = 10): animais que receberam injeções de 5-FU e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-CIS (n = 10): animais que receberam injeções CIS sem indução da PE. Grupo PE-CIS (n = 10): animais que receberam injeções de CIS e indução da PE após a primeira injeção.

2.2.4. Períodos experimentais e obtenção das amostras

Para as análises sanguíneas foram colhidos após anestesia geral 2,5 mL de sangue de cada animal por punção cardíaca nos momentos Baseline (antes da aplicação de SS ou quimioterápico), 7 dias e 30 dias após a aplicação da primeira dose de SS ou quimioterápico. Para análise fotométrica da PE, os animais foram eutanasiados pela administração de uma dose letal de Tiopental na dose de 150 mg/kg de peso corporal aos 7 e 30 dias após a aplicação da primeira dose de SS ou quimioterápico (Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil). A mandíbula de cada animal foi removida, separada e fixada em formaldeído tamponado a 4%, por um período de 48 horas. Após fixação as mandíbulas foram lavadas em água corrente e acondicionados em álcool a 70%. (Anexo B)

2.2.5. Fotometria

Para a análise fotométrica foi realizada uma adaptação da metodologia de Tatakis e Guglielmoni [30]. Os espécimes foram embebidos em solução de hipoclorito de sódio à 2,5% seguido pelo peróxido de hidrogênio para remoção da porção de tecido mole. Após secagem dos espécimes estes foram corados com solução de azul de metileno à 1% para facilitar a identificação da junção cimento-esmalte. Foram obtidas imagens digitais padronizadas, feitas com máquina fotográfica (D70 - Nikon Corporation, Japão.) da porção vestibular e lingual do primeiro molar inferior. Com o auxílio de um sistema de análise de imagens (ImageJ v.1.48 Software) foi calculada a área (mm²) de Perda óssea Alveolar (POA) ao redor do primeiro molar inferior, por vestibular e lingual, determinado a área sem osso da junção cimento-esmalte até a cista

óssea alveolar, em cada grupo e período experimental. Em cada espécime foi coletada 3 medidas em cada superfície analisada feitas em dias diferentes com intervalo de 1 dia entre elas. As mensurações foram feitas por um único examinador treinado, calibrado e cego ao experimento. (Anexo E)

2.2.6. Análises Hematológica e Bioquímica do Sangue

Para determinação dos leucócitos totais (LT) foram utilizados 0,5mL dos 2,5mL do sangue coletado, acondicionados em microtubos tipo Eppendorf, contendo anticoagulante (EDTA a 10%.) A contagem de LT foi realizada em contador de células automatizado (CC530 CELM, São Caetano do Sul, SP, Brasil). A avaliação morfológica e contagem diferencial dos leucócitos foi realizada segundo Feldman et al. (2000) [31].

A determinação da atividade total das enzimas ALT e AST e quantidade total de Creatinina e Ureia no soro foram realizadas pelo método cinético em espectrofotômetro semi-automatizado (SB-190 CELM, São Caetano do Sul, SP, Brasil) seguindo as normas do fabricante dos kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, MG, Brasil).

Para a determinação da atividade total das enzimas ALT e AST foi utilizado parte do soro sanguíneo obtido de 2 mL dos 2,5 mL de sangue coletado, acondicionado em microtubos tipo Eppendorf, que foram determinadas utilizando kits comerciais ALT/TGP e AST/GOT. Para as análises de creatinina e ureia, foi utilizado outra parte do soro sanguíneo obtido de 2 mL dos 2,5 mL de sangue acondicionado em microtubos tipo Eppendorf, que foram determinadas pelo modo cinético seguindo as normas do fabricante dos kits Ureia Vet e Crea K Vet.

2.2.7. Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil). Os dados das análises de POA, LT, AST, ALT, creatinina e ureia foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, em seguida foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA) a um critério e o pós teste de Tukey. O nível de significância dos testes foi de $p \leq 0.05$.

3. Resultados

3.1- Resultado da análise fotométrica

Os dados fotométricos demonstraram que na análise intragrupo, os animais do grupo SPE-SS, SPE-5FU e SPE-CIS não apresentaram perda óssea alveolar nos diferentes períodos, enquanto os animais dos grupos PE-SS, PE-5FU e PE-CIS apresentaram progressão da perda óssea alveolar no decorrer dos períodos ($p \leq 0,05$). Na análise intergrupo, os animais do grupo PE-5FU apresentaram maior perda óssea alveolar ($p \leq 0.05$) quando comparado com os animais dos grupos PE-SS e PE-CIS aos 30 dias. Os grupos PE-5FU, PE-SS e PE-CIS apresentaram significativa POA comparados aos grupos sem PE, entretanto não houve diferença significativa na comparação entre PE-SS e PE-CIS. Fig. 1

3.2. Resultado da análise dos Leucócitos Totais

Nos grupos SPE-5FU e PE-5FU é possível observar uma significativa redução do número de LT por microlitro aos 7 dias após a aplicação do quimioterápico quando

comparado ao Baseline. Nos grupos SPE-CIS e PE-CIS houve uma redução gradativa, porém não significativa no decorrer dos períodos quando comparado ao Baseline. Fig. 2

3.3. Resultado da análise de ALT e AST

Nos resultados para ALT, na análise intragrupo o período Baseline apresentou menor nível de ALT comparado com 7 dias nos grupos SPE-CIS, PE-SS, PE-5FU e PE-CIS, e com 30 dias nos grupos SPE-5FU, PE-5FU e PE-CIS ($p \leq 0,05$); o período de 7 dias apresentou menor nível de ALT comparado com 30 dias no grupo PE-5FU ($p \leq 0,05$). Na análise intergrupos o grupo SPE-SS apresentou menor nível de ALT aos 7 dias comparado com SPE-CIS, PE-SS, PE-5FU e PE-CIS e aos 30 dias comparado com SPE-5FU e PE-5FU ($p \leq 0,05$). O grupo PE-5FU apresentou maior nível de ALT aos 30 dias comparado aos grupos SPE-SS, SPE-5FU, SPE-CIS, PE-SS e PE-CIS ($p \leq 0,05$). Fig. 3

Para AST, na análise intragrupo o período Baseline apresentou menor nível de AST com 7 dias no grupo PE-SS, e com 30 dias nos grupos SPE-CIS, PE-5FU e PE-CIS ($p \leq 0,05$); o período de 7 dias apresentou menor nível de AST com 30 dias nos grupos SPE-CIS, PE-5FU e PE-CIS ($p \leq 0,05$). Na análise intergrupos o grupo SPE-SS apresentou menor nível de AST aos 7 dias comparado com PE-SS e aos 30 dias comparado com SPE-CIS e PE-5FU e PE-CIS ($p \leq 0,05$). O grupo PE-5FU apresentou maior nível de AST aos 30 dias comparado aos grupos SPE-5FU, PE-SS e PE-CIS ($p \leq 0,05$). O grupo PE-CIS apresentou maior nível de AST aos 30 dias comparado ao grupo PE-SS ($p \leq 0,05$). Fig. 4

3.4. Resultados da análise de Creatinina e Uréia

Na análise da Creatinina não houve diferença significativa na análise intragrupo. Na análise intergrupos o grupo SPE-SS apresentou menor nível de Creatinina aos 30 dias comparado com SPE-CIS e PE-CIS ($p \leq 0,05$). Fig. 5

Nos resultados dos níveis de Ureia, na análise intragrupo o período Baseline apresentou menor nível de Uréia com 7 dias no grupo PE-CIS, e com 30 dias nos grupos SPE-CIS e PE-CIS ($p \leq 0,05$) e maior nível de uréia comparado com SPE 5FU aos 7 e 30 dias e PE-5FU aos 7 e 30 dias ($p \leq 0,05$). Na análise intergrupos o grupo PE-CIS apresentou maior nível de Uréia aos 7 dias comparado com SPE-SS, SPE-5FU, SPE-CIS, PE-SS e PE-5FU e aos 30 dias os grupos SPE-CIS e PE-CIS apresentaram maior nível de ureia comparados com SPE-SS, SPE-5FU, PE-SS e PE-5FU ($p \leq 0,05$). Fig. 6

4. Discussão

Este estudo avaliou a relação entre a PE e os quimioterápicos 5-FU e CIS no agravamento dos danos hepáticos e renais em ratos. Sabe-se que o 5-FU e a CIS, que são drogas amplamente utilizadas no tratamento do câncer, podem acarretar danos ao fígado e rins pela toxicidade aos tecidos desses órgãos [14-17]. Além disso, a DP também pode exercer efeitos deletérios sobre os tecidos renais e hepáticos pela translocação do processo inflamatório via corrente sanguínea [22-24], o que de forma sinérgica aos efeitos do quimioterápico pode aumentar a debilidade do paciente submetido à quimioterapia. Os protocolos quimioterápicos para o tratamento do câncer costumam utilizar a associação de drogas com diferentes mecanismos de ação para potencializar o efeito terapêutico [8,32]. Por essa razão um modelo animal foi proposto para que se possa avaliar isoladamente o efeito do 5-FU ou da CIS sobre a influência da PE nas funções hepáticas e renais.

Em nosso estudo, a ação sistêmica das drogas quimioterápicas foi comprovada pela análise dos LT. Para os animais que receberam aplicação de 5-FU houve uma redução significativa dos LT após a aplicação do 5-FU no período de 7 dias, seguido de uma recuperação com aumento dos LT no período de 30 dias. Esse resultado está de acordo com estudo prévio que comprovou a imunossupressão nos animais que receberam aplicação sistêmica de 5-FU com a dose utilizada nesse estudo [26]. Para os animais que receberam aplicação sistêmica de CIS foi demonstrando uma redução nos valores de LT, porém de maneira não significativa, caracterizando uma menor imunossupressão causada pela CIS comparada ao 5-FU.

Ao avaliarmos a PE, observou-se que nos animais portadores de PE houve significativa perda óssea alveolar comparados aos animais sem indução da PE, corroborando com estudo prévio que utilizaram metodologia semelhante para indução da PE em ratos, onde a perda óssea alveolar ocorreu de maneira previsível após 7 dias [25]. Além disso, ao realizarmos a comparação entre os grupos portadores de PE, o grupo PE-5FU apresentou maior perda óssea alveolar aos 30 dias quando comparado aos grupos PE-SS e PE-CIS, denotando uma maior influência do quimioterápico 5-FU na severidade da progressão da PE. Os resultados do presente estudo estão de acordo com outros estudos realizado pelo grupo utilizando o quimioterápico 5-FU em ratos portadores de PE, onde também foi observado uma maior extensão e severidade do processo inflamatório nesses animais, demonstrando que o 5-FU aumenta o processo inflamatório causado pela PE [26,33,34].

Sabe-se que a DP pode estar associada a progressão de doenças hepáticas, como hepatite gordurosa não alcoólica, cirrose e carcinoma hepatocelular, além de afetar transplantes hepáticos através da translocação de bactérias, mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo [22]. Esses agentes patogênicos e mediadores inflamatórios presentes no sangue circulante, geram uma carga imunológica e hormonal lesiva para o fígado [35]. No presente estudo foi demonstrado que os animais do grupo PE-SS apresentaram elevação dos níveis séricos de ALT e AST após 7 dias da indução da PE, assim como maiores níveis de ALT e AST quando comparado ao grupo SPE-SS. Tal resultado está de acordo com estudo de Gulle et al. [36], que constatou maiores níveis de ALT e AST em animais com PE induzida. Mediadores inflamatórios presentes na DP e transcolados para o fígado, como IL-12/23, TNF- α e IL-1, podem levar ao recrutamento de neutrófilos, provocando lesões nos hepatócitos e nas células endoteliais

vasculares ao liberar oxidantes e proteases [37]. Em estudo clínico foi observado que os níveis de ALT e GGT eram mais elevados em pacientes com bolsas periodontais com profundidade ≥ 4 mm quando comparados aos pacientes saudáveis [38].

Determinadas drogas quimioterápicas são capazes de causar danos hepáticos pela sua toxicidade tecidual, sendo que os danos causados pela CIS podem estar relacionado ao estresse oxidativo [39] e os causados pelo 5-FU estão relacionados a sua metabolização hepática pela enzima dihidropirimidina desidrogenase [14]. Em nossos resultados ao avaliarmos as condições hepáticas nos grupos que receberam ambos os quimioterápicos foi observado que nos grupos SPE-CIS e SPE-5FU houve elevação dos níveis de ALT e AST. Além disso, foi observado que o grupo PE-5FU apresentou de maneira significativa maiores níveis de ALT e AST comparado ao grupo SPE-5FU, evidenciando que na presença da PE houve um agravamento dos danos hepáticos causados pelo quimioterápico 5-FU, o que não foi evidenciado entre os grupos SPE-CIS e PE-CIS. Esse resultado pode estar relacionado com nossos achados histométricos, no qual os animais do grupo PE-5FU apresentaram uma maior perda óssea comparado aos do grupo PE-CIS, denotando que o comprometimento periodontal foi mais acelerado no grupo PE-5FU. Em estudos prévios realizados pelo grupo utilizando o quimioterápico 5-FU em ratos portadores de PE, observou-se que esses animais apresentavam uma grande extensão e severidade do infiltrado inflamatório [26,33,34]. Portanto, podemos inferir que de acordo com a maior severidade da PE nos ratos que receberam aplicação de 5-FU, houve um maior processo inflamatório e uma maior translocação pela corrente sanguínea dos mediadores inflamatórios que podem ter atuado de forma sinérgica com o quimioterápico, aumentando a severidade dos danos hepáticos.

Os rins desempenham quatro funções essenciais: excreção dos produtos finais do metabolismo, em especial a ureia; regulação do volume sanguíneo e concentração de eletrólitos; regulação da produção de eritrócitos no osso medular através da secreção de eritropoietina; e participação na homeostase de cálcio através da hidroxilação de vitamina D3 em metabolitos ativos ou inativos [40]. A função renal pode ser avaliada pela mensuração da TFG, que também pode ser analisada usando a concentração sérica de Creatinina [41]. Portanto a avaliação da Creatinina sérica pode ser um parâmetro para avaliar a associação entre DP e função renal [42]. Em nosso estudo não houve diferença significativa nos níveis de Creatinina e Uréia entre os grupos SPE-SS e PE-SS corroborando com estudo realizado por França et al. [43] que não demonstrou alterações significativas nos marcadores séricos das funções renais em ratos portadores de PE. Porém é importante salientar que esse mesmo estudo encontrou mudanças significativas na histologia renal, no estresse oxidativo renal e na peroxidação lipídica associada à periodontite [43]. Portanto podemos supor que os parâmetros avaliados em nosso estudo não foram suficientes para detectar as possíveis alterações renais decorrentes da PE, pois é necessário que ocorra 70% ou mais da perda de função renal para que acarrete elevação dos níveis de creatinina e ureia [44]. Por outro lado, diversos estudos concluíram que em pacientes portadores de DP, por apresentarem níveis elevados de alguns marcadores inflamatórios na circulação como albumina e PCR [23], foi encontrada uma associação significativa entre a inflamação periodontal e a incidência cumulativa de deterioração da função renal [21,23,45].

Nos grupos que receberam aplicação de ambos os quimioterápicos não foi observado diferença significativa nos níveis de creatinina no decorrer dos períodos. Por outro lado ao avaliarmos os níveis de ureia foi possível observar uma elevação

significante nos grupos SPE-CIS e PE-CIS aos 7 e 30 dias comparados ao baseline evidenciando os danos renais ocasionados pelo quimioterápico CIS [17]. Adicionalmente o grupo PE-CIS apresentou de maneira significativa maiores níveis de ureia aos 7 dias comparado com SPE-CIS. Deste modo podemos supor que a PE agravou os danos causados pelo quimioterápico CIS ao funcionamento renal logo nos períodos iniciais. Porém, diante da significativa elevação dos níveis de ureia e creatinina nos grupos SPE-CIS e PE-CIS podemos inferir que os danos renais causados pelo quimioterápico CIS se sobrepôs aos demais fatores contribuintes para o agravamento da lesão. O dano aos túbulos renais é reconhecidamente um importante fator patogênico na nefrotoxicidade por CIS. A CIS acumula-se em altas concentrações nas células tubulares renais, levando a lesões tubulares e morte celular [18]. Além disso foi observado que pacientes submetidos ao tratamento de câncer com CIS ainda apresentavam platina circulante detectável no plasma após 10 anos de administração da droga, fato que exige atenção pois pode levar ao aparecimento de efeitos colaterais de longo prazo [46].

É importante ressaltar que o modelo experimental adotado, mesmo sendo adequado e amplamente utilizado para avaliação da toxicidade tecidual de quimioterápicos [17,47] ou da DP, apresenta limitações e deve ser visto com cautela quanto a interação entre a DP e o agravamento das lesões hepáticas e renais causadas pelos quimioterápicos. O rato é um animal frequentemente utilizado em estudos para avaliação hepática e renal [48,49], assim como para pesquisa periodontal [29,25,33,34]. Além disso, estudos realizados em ratos com PE que foram submetidos ao tratamento com aplicação sistêmica de drogas demonstraram que este é um modelo adequado e previsível [25,33,34]. Na PE a inflamação é estabelecida de forma rápida sendo

observada uma evidente destruição periodontal em 7 dias [29], desta forma acredita-se que ocorra a translocação da inflamação de forma sistêmica que possa afetar outros órgãos [43,50]. Além disso, vale salientar que além das análises bioquímicas propostas no presente estudo, outras análises são necessária para melhor elucidar a inter-relação entre as lesões hepáticas e renais causadas pelos quimioterápicos e a PE.

Elucidar fatores que contribuam negativamente no estado geral do paciente submetido a tratamento oncológico com quimioterápicos é fundamental para que se elabore adequadas terapias de suporte aos protocolos terapêuticos estabelecidos, minimizando os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Diante dos resultados apresentados no presente estudo, podemos concluir que a PE contribuiu para o agravamento dos danos hepáticos causados pelo 5-FU e agravou de maneira menos intensa os danos renais causados pela CIS, o que nos leva a crer que a elaboração de protocolos terapêuticos para tratamento da DP prévios a administração dos quimioterápicos são necessários para minimizar os efeitos deletérios hepáticos e renais causados pela associação da DP aos quimioterápicos.

Agradecimentos

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, São Paulo. À CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2014/11427-8).

Referências Bibliográficas

1. **World Health Organization/Cancer.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 23 de março 2017.
2. Shurin GV, AN, Shurin MR (2009) Cancer Therapy and Dendritic Cell Immunomodulation, in Dendritic Cells in Cancer, MRS a RD. Salter, Ed, Springer: NY. :201-216.
3. Zorzi D, Laurent A, Pawlik TM, Lauwers GY, Vauthey JN, Abdalla EK (2007) Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. Br J Surg. 94(3):274-286.
4. King PD, Perry MC (2001) Hepatotoxicity of chemotherapy. Oncologist 6(2):162-176.
5. Sato K, Watanabe S, Ohtsubo A, Shoji S, Ishikawa D, Tanaka T, Nozaki K, Kondo R, Okajima M, Miura S, Tanaka J, Sakagami T, Koya T, Kagamu H, Yoshizawa H, Narita I. (2016) Nephrotoxicity of cisplatin combination chemotherapy in thoracic malignancy patients with CKD risk factors. BMC Cancer 15;16:222.
6. Half E, Arber N (2009) Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. Expert Opin Pharmacother 10:211-219
7. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, Cullen K, Sarlis N, Tishler R, Tan M, Fasciano J, Sammartino DE, Posner MR, TAX 324 Study Group. (2011) Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 12:153-159.
8. Vermorken JB, Peyrade F, Krauss J, Mesía R, Remenar E, Gauler TC, et al. (2014) Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). Ann Oncol 25:682-688.

9. Dewit L (1987) Combined treatment of radiation and cisdiamminedichloroplatinum (II): a review of experimental and clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13:403–426.
10. Pang SK, Yu CW, Au-Yeung SCF, Ho YP (2007) DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 363:235–240.
11. Zhang J, Liu L, Gong Y, Zheng X, Yang M, Cui J, Shen S (2009) Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum(II) complexes. *Eur J Med Chem* 44:2322-2327.
12. Arias JL (2008) Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. *Molecules* 13:2340-2369.
13. Wisniewska-Jarosinska M, Sliwinski T, Kasznicki J, Kaczmarczyk D, Krupa R, Bloch K, Drzewoski J, Chojnacki J, Blasiak J, Morawiec-Sztandera A (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells. *Molecular Biology Reports* 38:3679-3688.
14. Lunenburg CA, Henricks LM, Guchelaar HJ, Swen JJ, Deenen MJ, Schellens JH, Gelderblom H (2016) Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time. *Eur J Cancer* 54:40-48.
15. Rabik CA, Dolan ME (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33:9–23.
16. Karasawa T, Steyger PS (2015) An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicol Lett* 237:219-227.
17. Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z (2009) The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:505-511.
18. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, Taylor GW, Page RC, Beck JD, Genco RJ (2015) Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 86(5):611-622.

19. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE (2014) Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 64:57-80.
20. Han P, Sun D, Yang J (2016) Interaction between periodontitis and liver diseases. *Biomed Rep* 5(3):267-276.
21. Da Costa TA, Silva MJ, Alves PM et al. (2015) Inflammation Biomarkers of Advanced Disease in Nongingival Tissues of Chronic Periodontitis Patients. *Mediators Inflamm* 2015: 983782.
22. Yoshihara A, Sugita N, Iwasaki M, Wang Y, Miyazaki H, Yoshie H, Nakamura K (2017) Relationship between renal function and periodontal disease in community-dwelling elderly women with different genotypes. *J Clin Periodontol* 44(5):484-489.
23. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ (2013) Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14:S1-7.
24. Chambrone L, Foz AM, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Artese HP, Feres M, Romito GA (2013) Periodontitis and chronic kidney disease: a systematic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. *J Clin Periodontol* 40(5):443-56.
25. Theodoro LH, Longo M, Ervolino E, Duque, C; Ferro-Alves ML, Assem NZ, Louzada LM, Garcia VG. (2016) .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.* 51:669-680.
26. Havelka AM, Berndtsson M, Olofsson MH, Shoshan MC, Linder S. (2007) Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 7, 1035-1039.
27. Du Bois D & Du Bois EF (1989) A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Nutrition* 17, 303-311.
28. Nakasato T, Izumisawa M, Akahane A, Kikuchi K, Ehara S, Shoji S, Kogi S, Mizuki H, Sugiyama Y (2012) Combined intra-arterial infusion and systemic chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Japanese Journal of Radiology* 30, 752-761.

29. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. (2007) Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology* 78, 566-575.
30. Tatakis DN, Guglielmoni P (2000) HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. *J Periodontol* 71:1395-1400.
31. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (2000) Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins p.1344.
32. Yang JS, Wang T, Qiu MQ, Li QL. (2015) Comparison of efficacy and toxicity profiles between paclitaxel/lobaplatin- and cisplatin/5-fluorouracil-based concurrent chemoradiotherapy of advanced inoperable oesophageal cancer. *Intern Med J.* 45(7):757-761.
33. Garcia VG, Novaes VC, De Almeida JM, et al. (2015) Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer.*;23:2007-2017.
34. Theodoro LH, Longo M, Novaes VCN, et al. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. *Support Care Cancer.*2017;doi: 10.1007/s00520-017-3738-0. [Epub ahead of print]
35. Abu-Shanab A, Quigley EM. (2010) The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 7(12):691-701.
36. Gulle K, Akpolat M, Kurcer Z, Cengiz MI, Baba F, Acikgoz S. (2014) Multi-organ injuries caused by lipopolysaccharide-induced periodontal inflammation in rats: role of melatonin. *J Periodontal Res.* 49(6):736-741.
37. Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ. (1998) Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC. *Hepatology.* Apr;27(4):1172-1177.
38. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima A. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas*

- gingivalis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. (2012) *BMC Gastroenterol.* 16;12:16.
39. Waseem M, Bhardwaj M, Tabassum H, Raisuddin S, Parvez S. (2015) Cisplatin hepatotoxicity mediated by mitochondrial stress. *Drug Chem Toxicol.* 38(4):452-9.
 40. Fogo A, Kon W (2004). Pathophysiology of progressive chronic renal disease. In: Avner EED, Harmon WE, Niaudet P, eds. *Textbook of Pediatric Nephrology*, 5th edn. Lippincot, Williams & Wilkins: Philadelphia:1267–1480.
 41. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. (2006) Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 145(4):247-254.
 42. Caúla AL, Lira-Junior R, Tinoco EM, Fischer RG. (2015) Serum creatinine and alkaline phosphatase levels are associated with severe chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 50(6):793-7.
 43. França LFC, Vasconcelos ACCG, da Silva FRP, Alves EHP, Carvalho JS, Lenardo DD, de Souza LKM, Barbosa ALR, Medeiros JR, de Oliveira JS, Vasconcelos DFP. (2017) Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *J Clin Periodontol.* 44(6):568-576.
 44. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. (2015) *Hematologia e bioquímica - Clínica veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: Cap 23.
 45. Ricardo AC, Athavale A, Chen J, Hampole H, Garside D, Marucha P, Lash JP. (2015) Periodontal disease, chronic kidney disease and mortality: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *BMC Nephrol.* 7;16:97.
 46. Gietema JA, Meinardi MT, Messerschmidt J, Gelever T, Alt F, Uges DR, Sleijfer DT. (2000) Circulating plasma platinum more than 10 years after cisplatin treatment for testicular cancer. *Lancet.* 25;355(9209):1075-1076.

47. Al-Asmari AK, Al-Zahrani AM, Khan AQ, Al-Shahrani HM, Ali Al Amri M. (2016) Taurine ameliorates 5-flourouracil-induced intestinal mucositis, hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats: A biochemical and histological study. *Hum Exp Toxicol.* 35(1):10-20.
48. Li D, Wang X, Liu B, Liu Y, Zeng Z, Lu L, Zheng Z, Li B, Zheng Z. (2014) Exercises in hot and humid environment caused liver injury in a rat model. *PLoS One.* 30;9(12):e111741.
49. Tam VH, Ledesma KR, Bowers DR, Zhou J, Truong LD. (2015) Kidney injury associated with telavancin dosing regimen in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(5):2930-2933.
50. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Maruyama T, Morita M (2011). Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. *Biomedical Research*, 5:343–349.

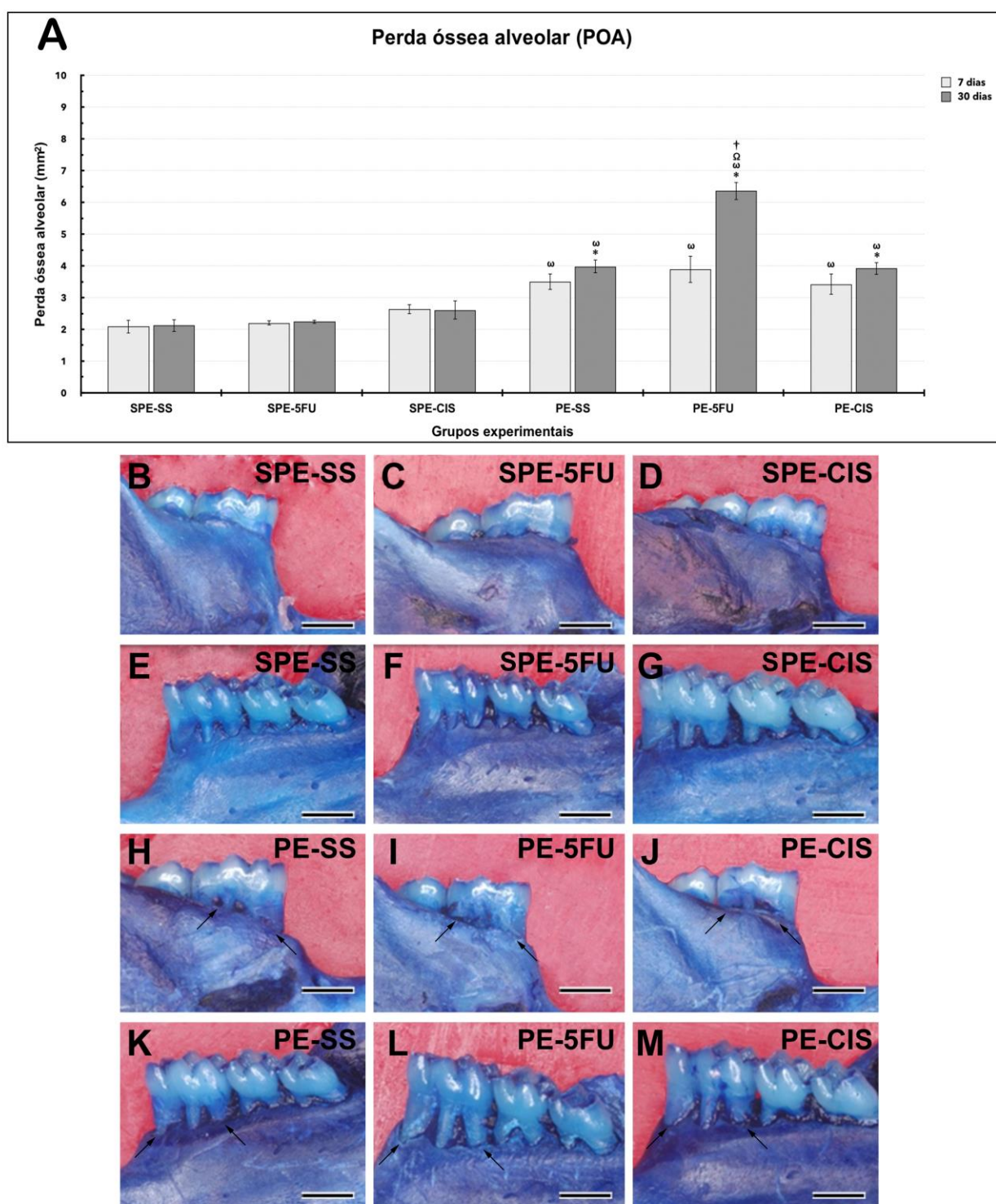


Fig. 1: A: Gráfico mostrando média e desvio padrão da POA (vestibular e lingual) do primeiro molar inferior em cada grupo e período. Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias. ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS, SPE-CIS e SPE-5FU nos mesmos períodos. Ω Diferença estatisticamente significativa com PE-SS nos mesmos períodos. † Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p = 0,05$). B-G: Imagens representativas do osso alveolar vestibular (B-D) e lingual (E-G) dos animais não portadores de PE que não foram submetidos a quimioterapia (B/E) e submetidos a quimioterapia com 5-FU (C/F) ou CIS (D/G) aos 30 dias. H-M: Imagens representativas do osso alveolar vestibular (H-J) e lingual (K-M) dos animais portadores de PE que não foram submetidos a quimioterapia (H/K) e submetidos a quimioterapia com 5-FU (I/L) ou CIS (J/M). Setas pretas indicando a perda óssea alveolar.

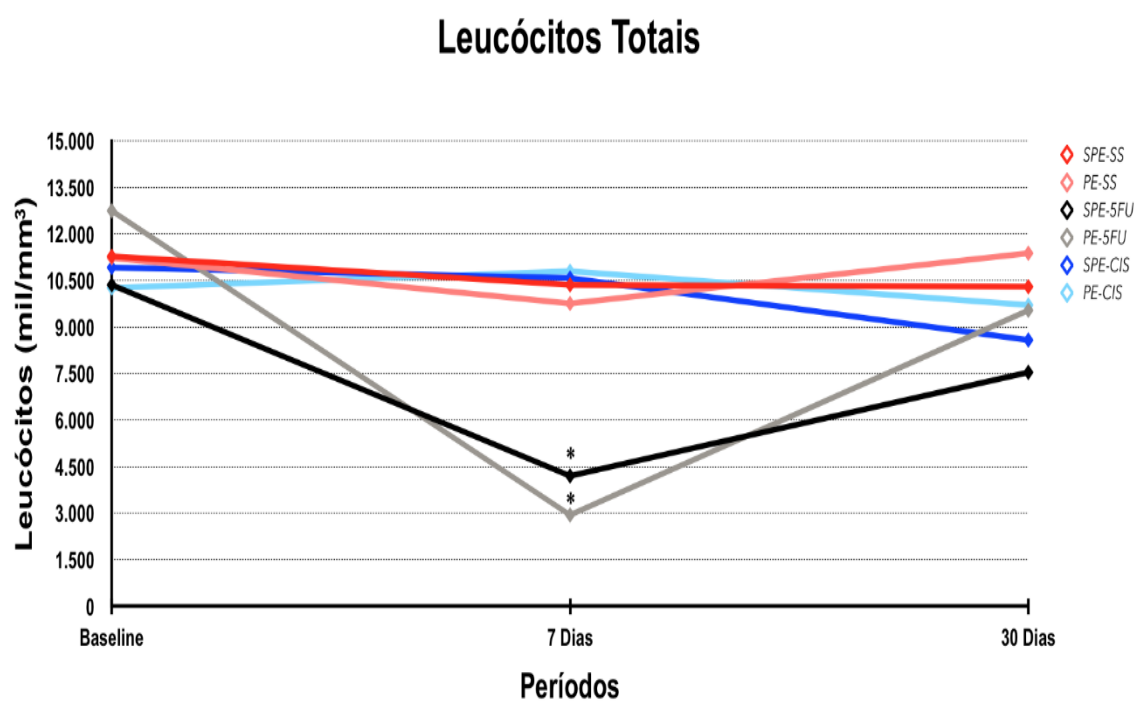


Fig. 2: Gráfico mostrando média dos Leucócitos Totais em cada grupo no decorrer dos períodos. Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa com Baseline. (Teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).

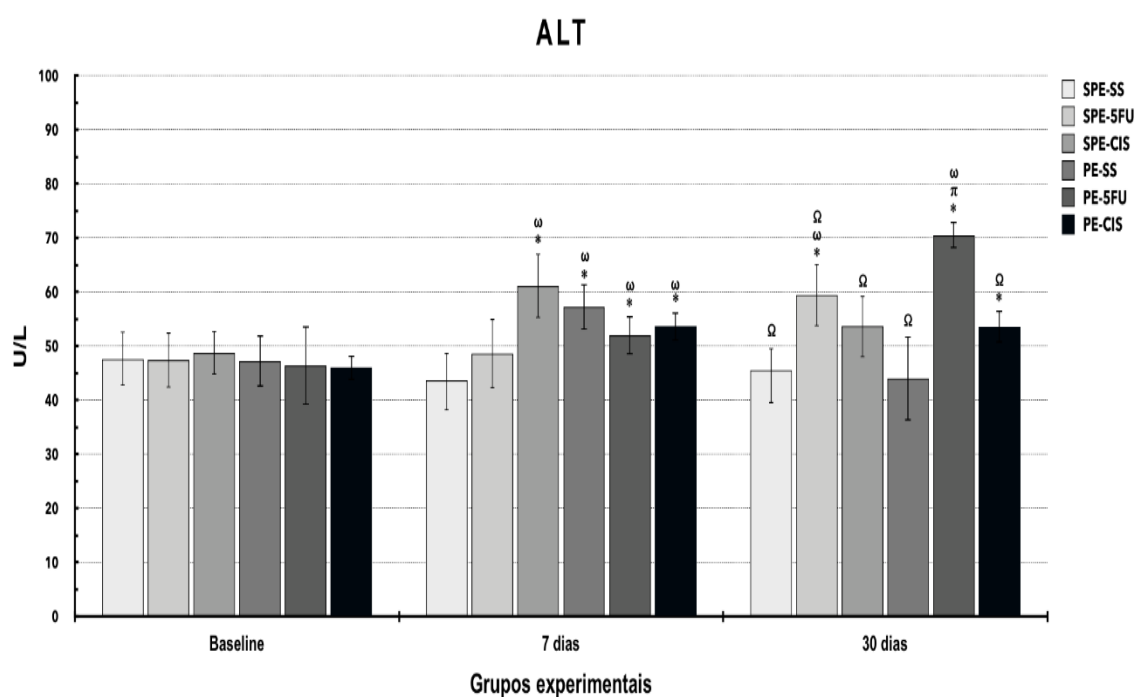


Fig. 3: Gráfico mostrando média e desvio padrão dos níveis de ALT de acordo com cada grupo e período. Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com Baseline. π Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias. ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS nos mesmos períodos. Ω Diferença estatisticamente significativa com PE-5FU nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).

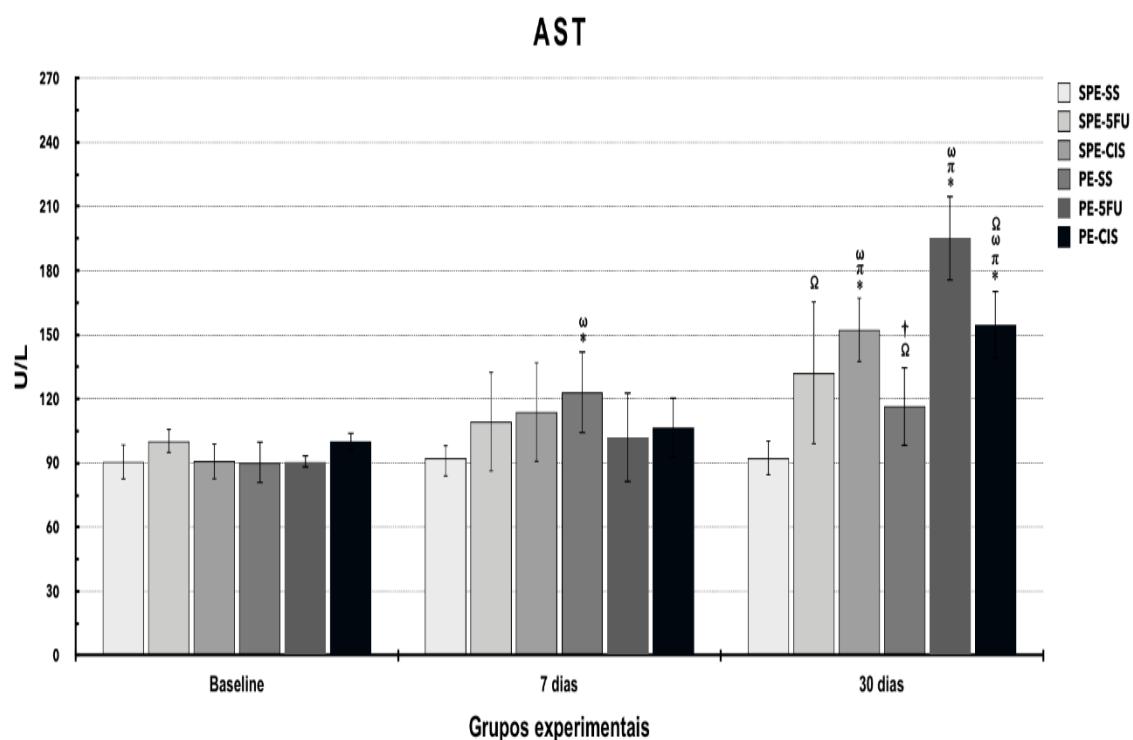


Fig. 4: Gráfico mostrando média e desvio padrão dos níveis de AST de acordo com cada grupo e período. Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com Baseline. π Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias. ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS nos mesmos períodos. Ω Diferença estatisticamente significativa com PE-5FU nos mesmos períodos. $\dagger$ Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).

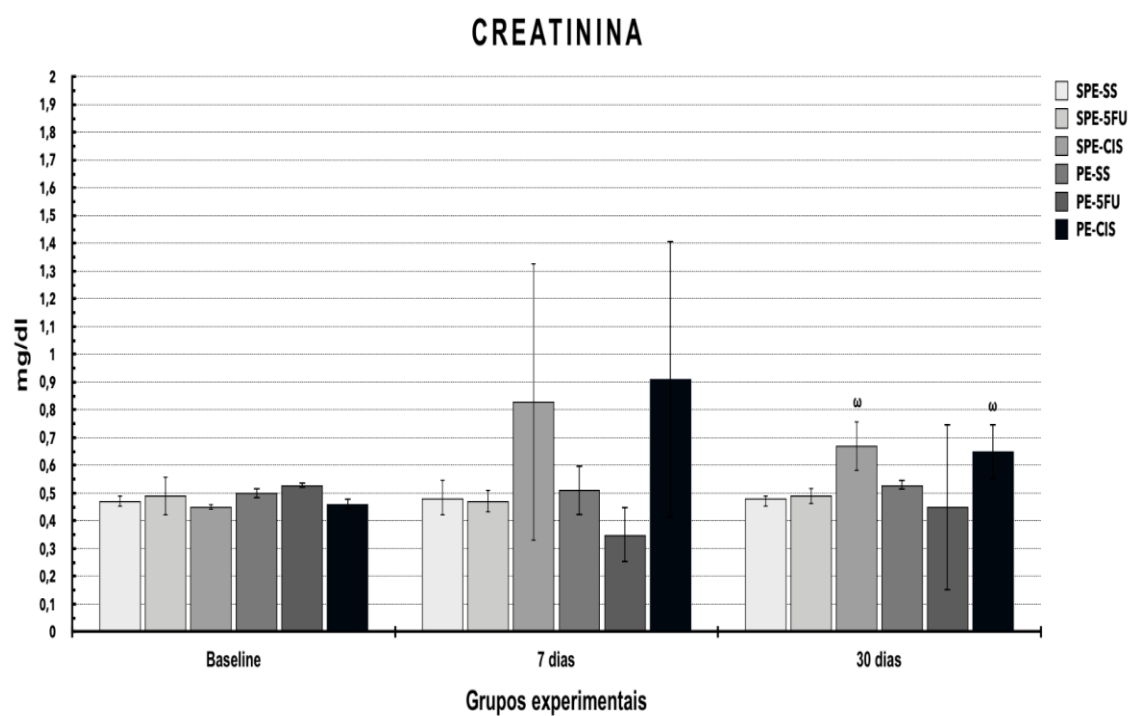


Fig. 5 - Gráfico representando os níveis de Creatinina de acordo com cada grupo e período. Abreviações: ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p < 0,05$).

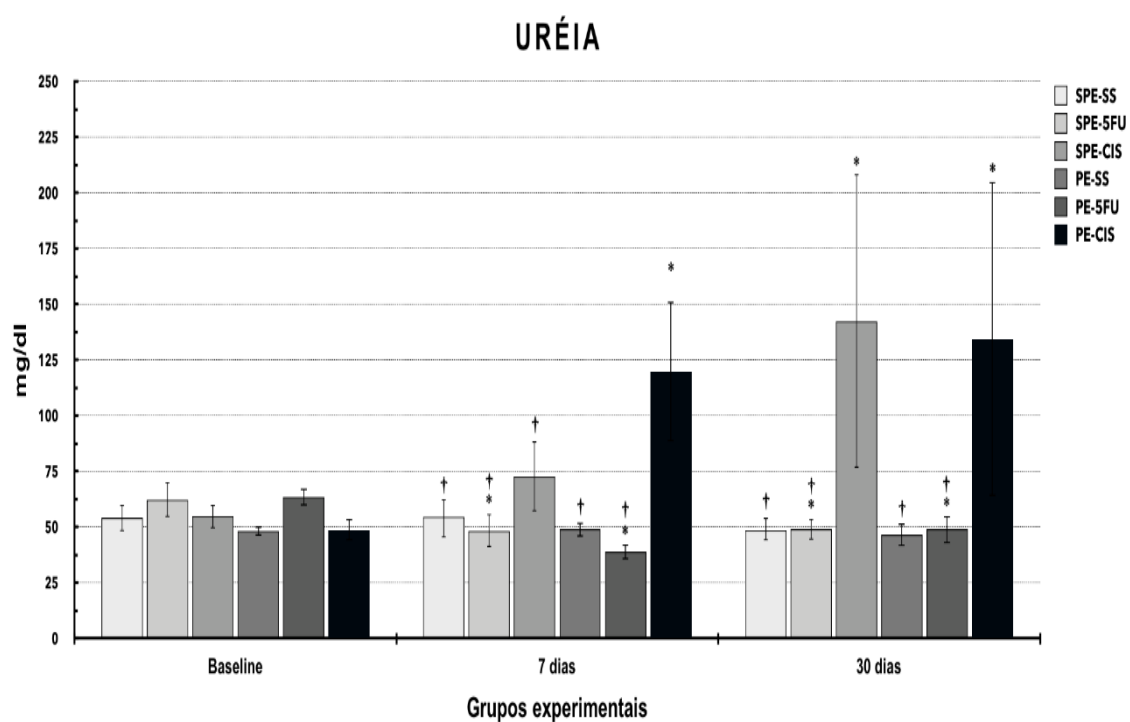


Fig. 6: Gráfico mostrando média e desvio padrão dos níveis de Ureia de acordo com cada grupo e período. Abreviações: * Diferença estatisticamente significante no mesmo grupo com Baseline. † Diferença estatisticamente significante com PE-CIS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).

Considerações

Finais

Considerações Finais

As neoplasias constituem-se na segunda causa de morte no Brasil, representando aproximadamente 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a estimativa para o biênio 2016/2017 é de 596 mil novos casos de câncer. Entre os homens, são esperados 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 300.800. As drogas antineoplásicas, embora comumente utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer, não têm suas atividades restritas apenas às células tumorais, podendo causar danos genotóxicos em células saudáveis (McGUIRE, 2002; ARIAS, 2008), debilitando o paciente e podendo interferir no protocolo terapêutico. Além do mais, a frequência e a severidade das condições que aumentam a morbidade do paciente dependem de fatores associados tanto ao paciente quanto à terapia antineoplásica, como o tipo de neoplasia, a droga utilizada e sua dose, o regime quimioterápico, a extensão da mielossupressão, além da idade do paciente, seu estado nutricional e os cuidados com a higiene oral (DOOD et al., 2001; KIM et al., 2012). Portanto, sabendo-se que a quimioterapia pode comprometer o estado geral do paciente, existe grande preocupação em se conhecer os efeitos dos quimioterápicos nos tecidos que podem ser afetados por estas drogas e seu regime de administração, assim como a interação dos quimioterápicos com condições inflamatórias preexistentes, como a periodontite. Essa associação pode interferir agravando a progressão da DP local (GARCIA et al., 2015; THEODORO et al., 2016; THEODORO et al., 2017) ou mesmo potencializar danos sistêmicos em decorrência do efeito sinérgico da toxicidade dos quimioterápicos em determinados órgãos (ABDOU et al., 2014; LI et al., 2015; TAM et al., 2015) com os danos sistêmicos ocasionados pela

inflamação periodontal (YOSHIHARA et al., 2017; HAN et al., 2016; DA COSTA et al., 2015).

Diante de nossos resultados ao avaliarmos a influência dos quimioterápicos 5-FU e CIS na evolução da PE, observou-se que ambos contribuíram para o agravamento da evolução da PE por duas vias: aumentando a intensidade e duração do processo inflamatório. Portanto observou-se além da intensidade maior do processo inflamatório, o tempo que perdurou o intenso processo inflamatório periodontal foi mais prolongado nos animais que receberam ambos os quimioterápicos. Além disso, observou-se diminuição da capacidade de reparo tecidual por redução do “turnover” celular e vascular. Quando a duração do processo inflamatório é prolongada por uma condição sistêmica, ocorre o atraso na fase de formação óssea, reduzindo significativamente a capacidade de formação óssea reparativa (GRAVES et al., 2011). Além do que, a angiogênese é fator determinante para o processo de reparo ósseo (WANG et al. 2007). Desta forma, a influência dos quimioterápicos 5-FU e CIS na evolução da PE resultou de forma significativa maior perda óssea, porém comparativamente esta foi maior nos animais que receberam aplicação de 5-FU do que de CIS, denotando uma maior influência do 5-FU na severidade da PE.

Sabe-se que os mecanismos infecciosos e inflamatórios relacionados à DP (VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013) são capazes de alterar diversas condições sistêmicas (CHAPPLE et al., 2013; CHAMBRONE et al., 2013; PAPAPANOU, 2015; HAN et al., 2016), o que associada as alterações hepáticas e renais causadas pelo 5-FU ou CIS (LUNENBURG et al., 2016; KARASAWA et al., 2015), podem potencializar os danos causados à esses órgãos. Portanto, ao avaliarmos de forma sistêmica a influência da PE sobre as funções hepáticas e renais em animais que receberam aplicação de 5-FU

ou CIS observou-se que a PE associada ao 5-FU apresentou de maneira significativa maiores níveis de ALT e AST, evidenciando que na presença da PE houve um agravamento dos danos hepáticos causados pelo quimioterápico 5-FU e a CIS apresentou de maneira significativa maiores níveis de ureia e não apresentou diferença significativa nos níveis de creatinina, demonstrando que a PE agravou os danos renais ocasionados pela CIS em apenas um dos parâmetros avaliados no presente estudo.

O tratamento de qualquer condição patológica preexistente na cavidade oral, como restaurações insatisfatórias, DP, má higiene oral e demais processos infecciosos constituem um aspecto importante do tratamento geral de pacientes com câncer (HONG et al., 2010). Os efeitos colaterais do tratamento do câncer podem prejudicar significativamente a qualidade de vida dos pacientes e uma saúde bucal adequada pode minimizar essas sequelas. Porém, normalmente a prioridade terapêutica é dada à condição letal que é o câncer, e administrar os cuidados bucais tornou-se uma atividade frequentemente negligenciada (BARKER et al., 2005). No entanto, uma abordagem multidisciplinar envolvendo as diversas áreas da saúde pode favorecer o paciente e ajudar a elaborar alternativas terapêuticas que possam minimizar as sequelas e os efeitos adversos das terapias para tratamento do câncer (WONG 2014).

Elucidar os fatores que contribuem negativamente no estado geral do paciente submetido a tratamento oncológico com quimioterápicos é fundamental para que se elabore adequadas terapias de suporte aos protocolos terapêuticos estabelecidos, minimizando os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, as estratégias para a implementação de protocolos de cuidados bucais e uma melhor integração dos serviços odontológicos e médicos devem ser desenvolvidas. Diante de nossos resultados, podemos concluir que ambos os quimioterápicos, 5-FU ou

CIS, exacerbaram a severidade da PE, sendo que os danos periodontais causadas pelo 5-FU foram comparativamente mais severos e mais rápido do que os causados pela CIS. Adicionalmente, a PE agravou os danos hepáticos causados pelo 5-FU e agravou de maneira menos evidente os danos renais causados pela CIS. Dessa forma concluímos que a elaboração de protocolos terapêuticos para tratamento da DP, de preferência prévios a administração dos quimioterápicos são necessários para minimizar o agravamento da DP pelos quimioterápicos e os danos hepáticos e renais causados pelo efeito sinérgico da DP com os quimioterápicos.

Referências Bibliográficas das Considerações Finais

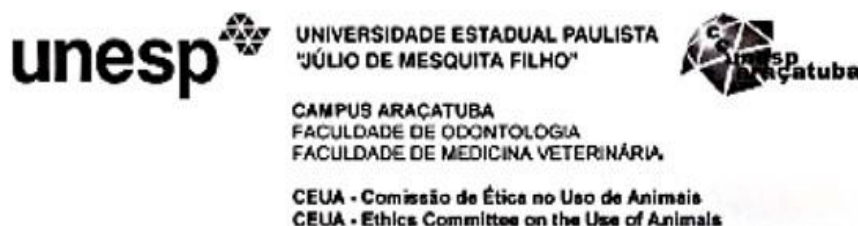
1. ABDOU, H.M.; HUSSIEN, H.M.; YOUSEF, M.I. Deleterious effects of cypermethrin on rat liver and kidney: protective role of sesame oil. **J Environ Sci Health B**. v. 47, p. 306-14, 2012.
2. ARIAS, J.L. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. **Molecules** v. 13, p. 2340-2369, 2008.
3. BARKER, G. J.; EPSTEIN, J. B.; WILLIAMS, K. B.; et al. Current practice and knowledge of oral care for cancer patients: a survey of supportive health care providers. **Supportive Care in Cancer**, v. 13, p. 32–41, 2005.
4. CHAMBRONE, L.; FOZ, A.M.; GUGLIELMETTI, M.R.; et al. Periodontitis and chronic kidney disease: a systematic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. **J Clin Periodontol**. v. 40, p. 443-456, 2013.
5. CHAPPLE, I.L.; GENCO, R.; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **J Periodontol**. v. 84, p. S106-112, 2013.
6. DA COSTA, T. A.; SILVA, M. J.; ALVES, P. M.; et al. Inflammation Biomarkers of Advanced Disease in Nongingival Tissues of Chronic Periodontitis Patients. **Mediators Inflamm**, 2015: 983782, 2015.
7. DODD, M.J.; DIBBLE, S.L.; MIASKOWSKI, C.; PAUL, S.; CHO, M. MacPHAIL, L.; LARSON, P.J.; GREENSPAN, D.; SHIBA, G. A comparison of the affective state and quality of life of chemotherapy patients who do and do not develop chemotherapyinduced oral mucositis. **J. Pain Symptom Manage**, v. 21, p. 498-505, 2001.
8. GARCIA, V.G.; NOVAES, V.C.; DE ALMEIDA, J.M.; et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**.v. 23, p. 2007-2017, 2015.
9. GRAVES DT, LI J, COCHRAN DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **J Dent Res**; v. 90, p. 143-153, 2011.

10. HAN P, SUN D, YANG J. Interaction between periodontitis and liver diseases. **Biomed Rep**, v. 5, p. 267-276, 2016.
11. HONG, C. H. L.; NAPENAS, J. J.; HODGSON, B. D. et al. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. **Supportive Care in Cancer**, v. 18, p. 1007–1021, 2010.
12. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>. Acesso em 25 de junho de 2017.
13. KARASAWA, T.; STEYGER, P.S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicol Lett.**, v. 237, p. 219-227, 2015.
14. 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.
15. LI, D.; WANG, X.; LIU, B.; et al. Exercises in hot and humid environment caused liver injury in a rat model. **PLoS One**. v. 9, e111741, 2014.
16. LUNENBURG, C.A.; HENRICKS, L.M.; GUCHELAAR, H.J.; SWEN, J.J.; DEENEN, M.J.; SCHELLENS, J.H.; GELDERBLOM, H. Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time. **Eur J Cancer**, v. 54, p. 40-48, 2016.
17. MCGUIRE, D.B. Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than muscositis and mouthwash. **Cancer Pract.** v. 10, p. 179-91, 2002.
18. PAPAPANOU, P.N. Systemic effects of periodontitis: lessons learned from research on atherosclerotic vascular disease and adverse pregnancy outcomes. **Int Dent J**. v. 65, p. 283-291, 2015.
19. TAM, V.H.; LEDESMA, K.R.; BOWERS, D.R.; et al. Kidney injury associated with telavancin dosing regimen in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 59, p. 2930-2933, 2015.
20. THEODORO, L.H.; LONGO, M.; ERVOLINO, E.; et al. 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.** v. 51, p. 669-680, 2016.

21. THEODORO, L.H.; LONGO, M.; NOVAES, V.C.N.; et al. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**, 2017. doi: 10.1007/s00520-017-3738-0. [Epub ahead of print]
22. VAN DYKE, T.E.; VAN WINKELHOFF, A.J. Infection and inflammatory mechanisms. **J Clin Periodontol**. v. 40, p. S1-7, 2013.
23. WANG, Y.; WAN, C.; DENG, L.; et al. The hypoxia inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. **J Clin Invest** v. 117, p. 1616–1626, 2007.
24. WONG, H.M. Oral complications and management strategies for patients undergoing cancer therapy. **ScientificWorldJournal**. 2014 eCollection 2014.
25. YOSHIHARA, A.; SUGITA, N.; IWASAKI, M.; et al. Relationship between renal function and periodontal disease in community-dwelling elderly women with different genotypes. **J Clin Periodontol**, 2017 [Epub ahead of print]

Anexos

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



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Influência de drogas quimioterápicas na evolução da periodontite experimental: estudo em ratos", Processo FOA nº 2014-00542, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de maio de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Março de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Abril de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Influence of chemotherapy drugs on the evolution of experimental periodontitis: a study in rats", Protocol FOA nº 2014-00542, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 19, 2014.

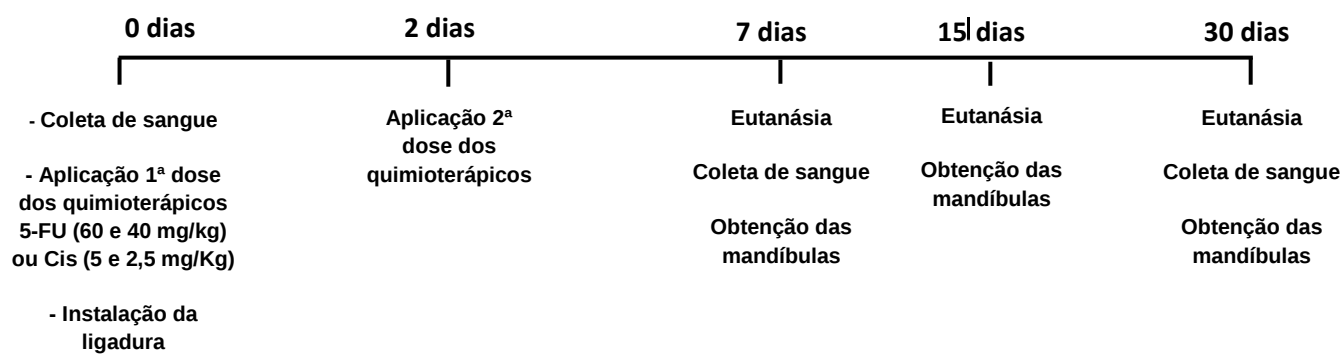
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 10, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 10, 2017.

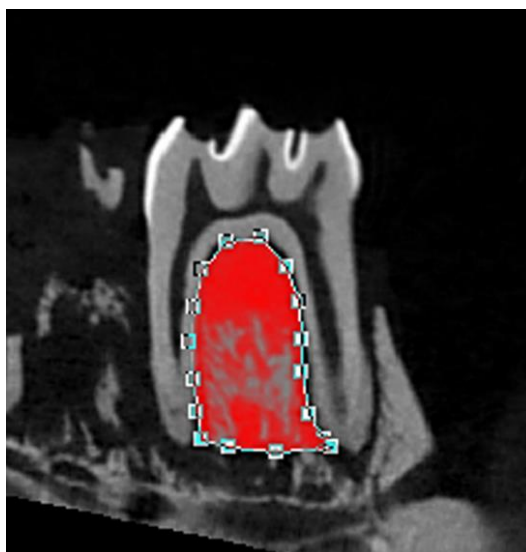

Profa. Dra. Maria Gisela Laranjeira
 Vice-Coordenadora da CEUA
 CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Aracatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
 Rua José Bonifácio, 1183 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
 Fone (16) 3636-3234 E-mail CEUA: ceua@foa.unesp.br

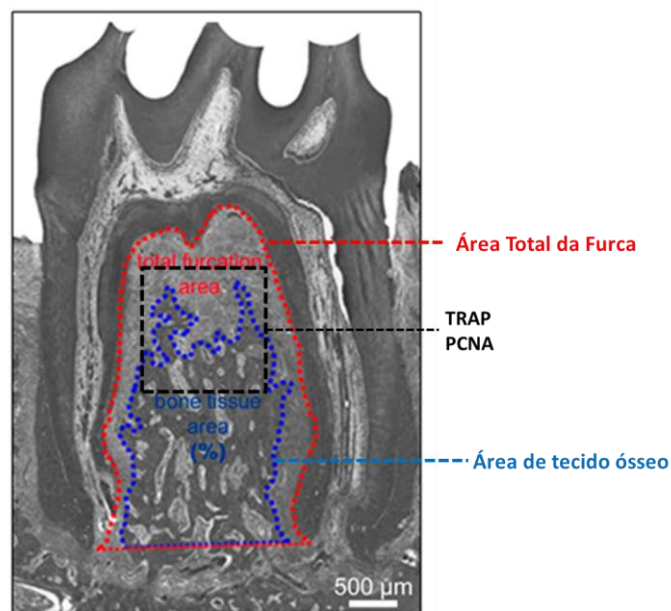
Anexo B – Delineamento do Estudo



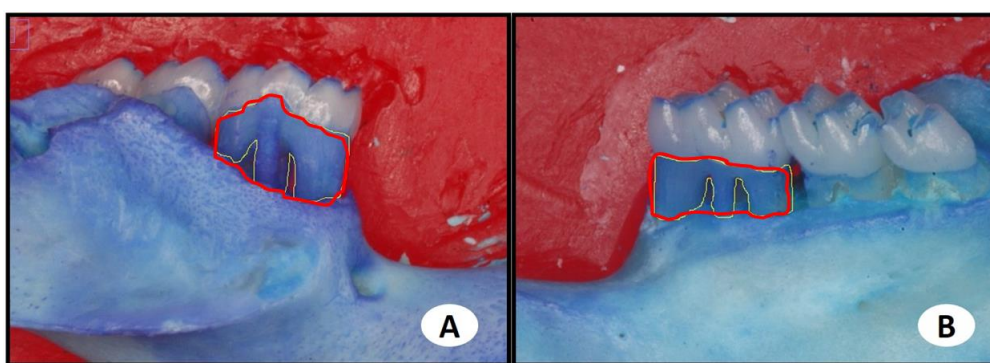
Anexo C – Figura Representativa da região de interesse (ROI) da análise de Porcentagem de Volume de Tecido Ósseo (PVTO).



Anexo D – Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica da PASO e área adotada para contagem de células TRAP e PCNA positivas.



Anexo E – Figura representativa da metodologia adotada para análise fotométrica da POA.



A – Traço vermelho: Região de perda óssea da porção vestibular do primeiro molar inferior. B – Traço vermelho: Região de perda óssea da porção lingual do primeiro molar inferior.

Anexo F - Normas para Publicação do Periódico Journal of Periodontology

Journal of Periodontology Author Instructions

*This update includes a general reorganization of the author guidelines as well as improved navigation. Other changes include **online-only publication**, **conflict of interest form collection**, and updates to **clinical trial registration** requirements.*

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at **ScholarOne Manuscripts**. To start a new submission, enter the Author Center and click "Click here to submit a new manuscript." Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under **General Format** and **Style**. All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- **Background:** Describes the problem being addressed.
- **Methods:** Describes how the study was performed.
- **Results:** Describes the primary results.
- **Conclusion(s):** Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and supplemental material as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

Publication of Accepted Original Articles

Please note that accepted manuscripts which are classified by the Editors as "Discovery Science" will be placed on an accelerated schedule for **online-only publication**. See [Online-Only Publication](#) below.

GENERAL FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom and all text should be double-spaced. Materials should appear in the following order:

- Title Page
- Abstract (or Introduction) and Key Words
- Text
- Footnotes
- Acknowledgment(s)
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology Digital Art Guidelines* for more information on submitting figures.

Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department, for each (please use footnote symbols in the sequence *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, etc. to identify authors and their corresponding institutions);
3. disclaimers, if any;
4. the name and address (including fax number and e-mail) of the author responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);
5. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;
6. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;
7. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from [MeSH documentation](#), to facilitate indexing should be listed below the abstract.

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

Following the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the *Journal of Periodontology* requires that all authors declare potential competing interests relating to papers accepted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.
2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission.

Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston,

Massachusetts. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation. Drs. Able, Kim, and Bruce report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>.

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology's* preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

1. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
2. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
3. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loë H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
4. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

Note: DOIs are preferred for journal articles. If a DOI is not available, please provide a URL and access date.

1. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limioli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
2. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.
3. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: http://www.cdc.gov/OralHealth/topics/periodontal_disease.htm. Accessed September 29, 2010.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The submission system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

FIGURES

Please see the *Journal of Periodontology Digital Art Guidelines* for detailed instructions on submitting high-quality images.

Figure Legends

Legends should be typed double-spaced with Arabic numbers corresponding to the figure. When arrows,

symbols, numbers, or letters are used, explain each clearly in the legend; also explain internal scale, original magnification, and method of staining as appropriate. Panel labels should be in capital letters. Legends should not appear on the same page as the actual figures.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliations; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, ††, etc.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The *Journal of Periodontology* includes supplementary material in the online Journal (www.joponline.org). All supplemental material should be called out in the text.

Supplementary Figures and Tables

Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplementary files. Each supplementary figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see [Digital Art Guidelines](#)) and tables (see above) when preparing supplementary figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementaryFigure1.tif, SupplementaryTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail jerry@perio.org.

Supplementary Videos

The *Journal of Periodontology* publishes short videos to supplement a paper when appropriate. Most standard video formats are accepted. Videos should be edited to remove extraneous material. Authors should adhere to OSHA regulations when preparing their videos. Please e-mail bethanne@perio.org for information on how to submit videos. If your video is accepted for publication, all authors will need to submit a video copyright form. This form can be found on [ScholarOne Manuscripts](#) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms."

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Once the *Journal* has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Jerry Eberle, Editorial Specialist) or e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted by each author. A link to this

electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission. Due to this, **all authors are required to have accounts with valid e-mail addresses in ScholarOne Manuscripts** and be listed as authors for the submitted paper. Submitting authors are able to create accounts for co-authors.

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects **AND** that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless written consent from the patient is submitted.

For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author's institutional experimentation committee or was in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

PRODUCT IDENTIFICATION

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted online at **ScholarOne Manuscripts** by the same author who submitted the original manuscript. Authors have 30 days to submit a revision. Revisions should adhere to the same requirements as original submissions. Additionally:

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
3. **Please upload a version of the manuscript with changes highlighted or track changes enabled. This should be uploaded as a supplemental file.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

The *Journal of Periodontology* is a peer-reviewed publication. All manuscripts, including Reviews, Commentaries, and Case Series are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor's communication.

Checking the Status of a Manuscript

During the peer-review process, the current status of a manuscript can be found in the Author Center (click "Submitted Manuscripts" or "Manuscripts I Have Co-Authored"). Once a decision has been made, all authors are notified by e-mail. No hard copy letters will be mailed.

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. All authors are required to sign a copyright form. An e-mail with a link to this electronic form will be sent to all authors upon acceptance.

Once all forms are received by the editorial office, an unedited version of the accepted manuscript will appear online ahead of print at <http://www.joponline.org/toc/jop/0/0>. Once a manuscript is online ahead of print, it is fully citable based on the Digital Object Identifier (DOI) assigned to the manuscript. Manuscripts will be copyedited, published online, and printed (unless online-only) in an issue of the *Journal* approximately 4 to 5 months after acceptance. Authors will be notified about a final publication date by the Editorial Office.

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading. Reprints can be purchased in 4-color or black and white. Electronic reprints are also available.

Online-Only Publication

Accepted manuscripts that are classified by the Editors as "Discovery Science" will be placed on an accelerated schedule for online-only publication. They will be assigned to an issue, copyedited, and published in the online *Journal*. Online-only manuscripts will be listed in the printed table of contents of the assigned issue but will not appear in the printed issue. Manuscripts are classified as "Discovery Science" if: a) the study is conducted in isolated cells or tissues to explore mechanisms relative to periodontitis/periodontal tissues; or b) the research is not within one step of clinical application.

Funding Agency Requirements

Consistent with current policies, authors who have papers based on funded research accepted for publication in the *Journal of Periodontology* may make their final accepted paper or published article available to agency depositories. However, authors should indicate that the paper may not be released publicly until 12 months following final publication in an issue.

Authors are responsible for complying with all funding agency requirements.

QUESTIONS

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Editorial Specialist, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3255; e-mail: jerry@perio.org.

Anexo G - Normas para Publicação do Periódico Journal of Supportive Care in Cancer.

Instructions for Authors

• Original Articles – body text is limited to 3500 words. There may be 45 references and no more than six figures/tables.

Review Articles – generally solicited by the editors but unsolicited proposals containing an abstract and outline can be sent to the editors for consideration. The word limit for Review Articles is up to 4,000 words for body text (excludes figures, charts, references, abstract).

Letter to the Editor – SCC occasionally accepts letters to the editor pertaining to articles published in the Journal. These should not exceed 1000 words body text and will be passed to the authors of the article to which the comment applies to solicit a response. There may be up to 10 references.

Commentary – articles should be on innovative areas or opportunities for further research. The body text is limited to 1,000 words. There may be up to 20 references, and one figure or chart.

Review procedure

All manuscripts undergo strict peer review. Manuscripts are initially considered by the Editor-in-Chief. Any manuscript that does not meet the general certain criteria of the journal, e.g.

- relevance to the aims of the journal with the topic being of overall general interest
- sufficiently original and contributing to the advancement of the field,
- clearly written with appropriate study methods, well-supported data and conclusions which are supported by the data

will be returned to the author without review.

All other submitted manuscripts are assigned to an Associate Editor who will manage the external peer review process and editorial decision. The Journal encourages authors to recommend individuals who could be considered as reviewers, providing the editorial office with full names and contact details. Authors are also given the opportunity to request the exclusion of a specific reviewer. In this case, authors should provide justification for their request.

Each manuscript is reviewed by a minimum of two expert referees who will provide unbiased, critical and independent assessment of the submission. The (corresponding) author is notified by email of the editorial decision, which will include any applicable criticisms and comments from the reviewers and managing editor. The decision to accept with/without revision or otherwise, will be made by the Editor-in-Chief based on the critical assessments of the experts.

Manuscripts which are returned to the authors for minor or major modifications should be resubmitted online within one or three months, respectively; otherwise, they will be considered withdrawn. Normally, revised manuscripts are reassessed by the same reviewers to determine if the authors have satisfactorily addressed their criticisms and comments. Depending upon this evaluation, the manuscript may be accepted or rejected. Any questions or concerns regarding the editorial decision on a manuscript must be submitted directly to the editorial office within 3 months.

Confidentiality

All manuscripts are treated by the assigned reviewers as privileged and confidential information. Reviewers may request advice from another party, subject to the general principles of confidentiality and permission of the managing editor. Reviewers' comments are not published or made available publicly except with the prior written permission of the reviewer, author and editor. However, reviewers' comments are shared with the other reviewers of the same paper, and reviewers will be notified of the

editor's decision. The reviewers' identity remains anonymous. All reviewers are asked to disclose any potential conflict that could influence their opinions of manuscripts, prior to review of manuscript.

Manuscript preparation

We urge authors to follow the guidelines for authors to speed up the review and publication process.

All manuscripts are subject to copyediting upon acceptance, however, authors are asked to ensure that manuscripts from non-native English language speakers should have the language and grammar checked by a native speaker or a professional agency. Poorly written articles cannot be reviewed and will be returned to the authors.

- **Authorship Criteria and Contributions**

All listed authors should have seen and approved the final version of the manuscript.

All authors of accepted articles must sign an authorship form affirming that they have met all three of the following criteria for authorship, thereby accepting public responsibility for appropriate portions of the content:

1. substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content;
3. approval of the version to be published and all subsequent versions.

If authorship is attributed to a group (such as for multi-center trials), the group must designate one or more individuals as authors or members of a writing group who meet full authorship criteria and who accepts direct responsibility for the manuscript.

Other group members who are not authors should be listed in the Acknowledgment section of the manuscript as participating investigators.

Individuals who do not meet the criteria for authorship but who have made substantial, direct contributions to the work (e.g., purely technical help, writing assistance, general or financial or material support) should be acknowledged in the

Acknowledgments section of the manuscript, with a brief description of their contributions. Authors should obtain written permission from anyone they wish to list in the Acknowledgments section.

- **Redundant, Duplicate or Fraudulent Publication**

Authors must not simultaneously submit their manuscripts to another publication if that manuscript is under consideration by Supportive Care in Cancer.

Redundant or duplicate publication is a paper that overlaps substantially with one already published in print or electronic media. At the time of manuscript submission, authors must inform the editor about all submissions and previous publications that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work. Any such publication must be referred to and referenced in the new paper.

Copies of such material should be included with the submitted paper as a supplemental file.

Authors must not:

- Willfully and knowingly submit false data
- Submit data from source not the authors' own
- Submit previously published material (with the exception of abstracts) without correct and proper citation
- Omit reference to the works of other investigators which established a priority
- Falsely certify that the submitted work is original
- Use material previously published elsewhere without prior written approval of the copyright holder

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Structured Abstract

Authors are asked to state the relevance of their manuscript to inform research, policies and/or programs.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
 - Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
 - Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
 - Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
 - Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
- Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- ISSN.org LTWA
If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)
Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)
Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- [Edanz English editing for scientists](#)