



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

TIAGO ESGALHA DA ROCHA

**Efeitos do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* no
tratamento da periodontite experimental em ratos
submetidos à quimioterapia**

**Araçatuba- SP
2021**

TIAGO ESGALHA DA ROCHA

**Efeitos do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* no
tratamento da periodontite experimental em ratos
submetidos à quimioterapia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de Periodontia).

Orientadora: Prof.^a Associada Letícia Helena Theodoro

Coorientador: Prof.^o Associado Edilson Ervolino

**Araçatuba- SP
2021**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R672e Rocha, Tiago Esgalha da.
Efeitos do probiótico *Saccharomyces cerevisiae*
no tratamento da periodontite experimental em ratos
submetidos à quimioterapia / Tiago Esgalha da
Rocha. - Araçatuba, 2021
65 f. : il.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Imunossupressão 2. Doenças periodontais
3. Ratos 4. Quimioterapia 5. Fluoruracila 6. Probióticos

I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados Curriculares

TIAGO ESGALHA DA ROCHA

Nascimento: 10/07/1996 – Araçatuba - SP

Filiação: João Luís Gomes da Rocha
Elisângela Volpe Esgalha Rocha

2014-2018 Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP

2019-2021 Curso de mestrado acadêmico pelo programa de pós-graduação em Odontologia, área de concentração Periodontia pela FOA-UNESP - com auxílio de bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

Associações CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo.
SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Links Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0801183678729907>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8228-3643>

Dedico este trabalho...

Ao meu Pai João Luís

Pai, exemplo que eu tenho de honestidade. Um exemplo de homem que sempre lutou para conseguir atingir os seus objetivos. Com você aprendi os valores da vida. Dedico a você tudo o que hoje conquistei e espero que consiga retribuir um pouco de todo o carinho, atenção e amor que o senhor me deu.

À minha mãe Elisângela

Mãe, meu porto-seguro, onde eu sei que sempre pude voltar quando precisava e até hoje quando preciso. É onde eu deixo todo o meu orgulho de lado e volto para os braços de quem mais me apoia nos momentos de angústia. Obrigado por todos os conselhos. Dedico minha vida a você, que não mediu esforços para que eu chegasse até o fim dessa etapa.

Aos meus irmãos Gabriel e Amanda

Gabriel, portador dos melhores conselhos. Por sermos gêmeos, não tem como discutir que a ligação entre nós é fantástica. Obrigado pelo seu apoio na minha vida, pode ter certeza que eu não seria o mesmo sem você. Muito sucesso nessa nova etapa da sua vida. **Amanda**, obrigado pelo carinho que você tem por mim e pela alegria que você traz para a casa. Saiba que meu carinho e admiração pela sua dedicação é imensa. Que seu caminho pela frente, na carreira que você escolheu seja de muito sucesso, acredito muito em você. Te amo.

À minha noiva Mariana

Amor, você é um exemplo de inteligência, amor, carinho e atenção. Sempre me apoiou em todas as minhas decisões, me ajudou a tomar decisões importantes para o meu futuro. Obrigado por fazer parte da minha vida, ontem, hoje e sempre. Saiba que sempre estarei do seu lado para todas as decisões que tomarmos, e estaremos juntos para enfrentar qualquer obstáculo que venha pela frente. Te amo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus e à Nossa Senhora

Meu Pai e Mãe do céu, obrigado por Teus planos na minha vida serem sempre maiores do que os meus. Agradeço pelo amparo em todos os momentos da minha vida e por ter me dado força para chegar ao fim dessa etapa, e sei que nada poderia ser feito sem a Vossa vontade.

“Tu és o meu abrigo e o meu escudo; e na Tua palavra deposito toda a minha esperança!”

Salmo 119:114

À minha orientadora Prof.^a Letícia Helena Theodoro

Professora, obrigado pela oportunidade de poder conviver e trabalhar com a senhora esses dois anos. Obrigado pela confiança, pela paciência e por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável e por me acolher nos primeiros passos da pós-graduação. Devo à senhora minha evolução como profissional e admiro a pessoa que a senhora é, por toda dedicação e comprometimento à docência e à pesquisa. Muito obrigado por tudo!

Ao meu co-orientador Prof. Edilson Ervolino

Professor, o senhor é exemplo de pessoa e profissional. Comprometido com o trabalho, com a ciência e com todos os alunos, sem exceção. Grande parte da minha evolução nos trabalhos científicos e na minha escolha de seguir a carreira acadêmica devo a você. Muito obrigado por todo o aprendizado no laboratório e na sala de aula, pela oportunidade do ingresso na iniciação científica e pelos conselhos profissionais.

Ao grande mestre e amigo Prof. Valdir Gouveia Garcia

Professor, é de todo coração que eu agradeço a sua participação na minha vida pessoal e profissional. Obrigado pelos sábios conselhos que me deu ao longo dessa jornada, os seus ensinamentos eu levarei por toda a minha vida. Obrigado por toda a experiência e conhecimento compartilhados. Minha admiração pelo senhor é imensa. Muito obrigado!

Aos Amigos de Pós-graduação

Aos que sempre me ajudaram a desenvolver as pesquisas, me acompanharam desde o primeiro ano de faculdade e tenho como amigos hoje e sei que levarei para sempre:

Luan, obrigado pelos conselhos, pela amizade e pela convivência. Tenho você como um grande amigo e sei que posso contar com você em tudo. Admiro muito a sua inteligência, o seu esforço e a sua dedicação com a pesquisa e docência. O sucesso já está acontecendo em sua vida, aproveite tudo o que a vida tem a oferecer e continue sendo esse exemplo de pessoa. Conte comigo com o que precisar!

Eduardo e Leonardo, muito obrigado pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade construída mesmo em pouco tempo, e principalmente pelos conselhos ao longo dessa jornada de mestrado. Vocês têm um futuro brilhante pela frente, aproveitem!

João, Thamires e Letícia, meus veteranos e chefes queridos, obrigado por todo o acolhimento. Tudo aquilo que aprendi na prática laboratorial devo a vocês. Obrigado também pelos conselhos de amigos que eu recebi durante todo o tempo e pela convivência com vocês.

Luy, eterno “bixo”, obrigado pela sua amizade, pelas risadas que você proporciona a todos dentro do departamento e pela ajuda sempre que precisava. Admiro muito a sua dedicação e esforço para conseguir atingir os seus objetivos.

Jéssica Freire, Isabella, Jéssica Santana e Vinícius obrigado por toda a ajuda na execução deste trabalho. Só tenho a agradecer pela tão boa convivência dentro e fora do departamento. Muito obrigado!

Ao que eu tive o prazer de trabalhar mesmo que em tão pouco tempo conquistamos essa amizade: Glauco, Nathalia, Vinicius, João Vitor, Marina, Mariane, Fernanda, Beatriz e Ana Carolina.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, e, em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, do senhor vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do coordenador do programa de pós-graduação em Odontologia **Prof. Assoc. André Luiz Fraga Briso** pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação e esta pesquisa.

Ao **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**, pela concessão de Bolsa de Mestrado CAPES-DS e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento da pesquisa (Processo nº 2013/0091).

Ao **Departamento de Diagnóstico e Cirurgia**, na pessoa do chefe de departamento **Prof. Dr. Francisley Ávila de Souza**, e aos servidores técnicos administrativos **Renato Gomes de Oliveira** e **Marco Aurélio de Oliveira Ianner**, pelo apoio e possibilidade de execução de toda a parte experimental do presente trabalho.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa da chefe de departamento **Profa. Assoc. Doutora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune**, e aos servidores técnicos administrativos **Eliseide Maria Ferreira Silva Navega**, **André Luís Mattos Piedade** e **Arnaldo César dos Santos**, pelo apoio e possibilidade de execução de toda a parte laboratorial do presente trabalho, e da agradável convivência.

Colegas e amigos de departamento, com os quais convivi em um ambiente extremamente agradável e amigável para a realização deste estudo.

Aos funcionários do **Biotério** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Camilo** e **João Batista** que ofereceram suporte para a obtenção dos animais utilizados nesta pesquisa.

A todos os meus **familiares**, em especial aos meus avós **Sidônio**, **Lourdes**, **João** (in memorian) e **Lázara**, aos meus tios, **Elaine**, **Éder**, **Leila**, **Eliana**, aos meus padrinhos e tios, **Rosemary** e **Pedro**, e todos os meus primos por me apoiarem nessa jornada. À **Silvia Regina**, **Carlos Alberto** e **Ana Laura Castilho** pelo

acolhimento, pelo apoio nas minhas decisões e pelos conselhos que recebi ao longo dessa caminhada.

Eternos amigos de longa data, **Caio, Alex, Felipe, Matheus e Bruno** pelo apoio e por me darem força para concluir mais essa etapa da minha formação. Amigos que levarei para o resto da vida.

Aos amigos de graduação, **Flávio, Arthur, Bianca, Guilherme, Henrique, Vinícius e Yugo**, no qual eu levo na minha vida para sempre, apesar da distância devido às diferentes escolhas profissionais que fizemos.

Enfim, aos **animais** dessa pesquisa, por servirem a ciência com suas próprias vidas, meu eterno respeito.

“Tudo vem de muito longe e tudo aponta para o futuro, de coisa alguma podendo afirmar-se com segurança se é somente o fim ou se já é princípio”

(C. G. Jung)

ROCHA, T. E. **Efeitos do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* no tratamento da periodontite experimental em ratos submetidos à quimioterapia.** 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

O presente estudo teve a finalidade de avaliar os efeitos do uso do probiótico (PRO) *Saccharomyces cerevisiae* coadjuvante à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da periodontite experimental (PE) induzida em animais imunossuprimidos com o quimioterápico 5-Fluorouracil (5FU). Cento e oito animais foram submetidos à indução da PE por meio da instalação de um fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo ou direito. A imunossupressão foi obtida pela injeção intraperitoneal do 5FU aplicada em dois momentos: no ato da instalação da ligadura e após 48 horas. Sete dias após instalação a ligadura foi removida e os animais separados aleatoriamente em seis grupos experimentais que receberam os seguintes tratamentos: PE (n=18) - animais que não sofreram nenhum tratamento sistêmico ou local; SS (n=18) - animais que não sofreram tratamento local, apenas tratamento sistêmico com solução salina (SS); 5FU (n=18) - animais tratados sistemicamente com 5FU que não sofreram nenhum tratamento local; 5FU-PRO (n=18) - animais tratados sistemicamente com 5FU que receberam irrigação local com 0,6 ml de PRO; 5FU-RAR (n=18) - animais tratados sistemicamente com 5FU que receberam RAR e; 5FU-RAR-PRO (n=18) - animais tratados sistemicamente com 5FU, que receberam tratamento com RAR e irrigação local com 0,6 ml de PRO. Seis animais de cada período foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 e 30 dias após os tratamentos. Os espécimes contendo a área interessada foram obtidos e processados para a análise histopatológica, histométrica da perda óssea alveolar (POA), porcentagem de tecido ósseo (PTO), porcentagem de osso vital (POV) e porcentagem de osso não vital (PONV), e análise imunoistoquímica (TRAP, RANKL e OPG). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($\alpha=5\%$). Os resultados histológicos demonstraram que nos espécimes tratados com 5FU houve agravamento da perda óssea na região de furca comparado com os animais sistemicamente saudáveis (grupos PE e SS); que o tratamento com PRO como monoterapia (grupo 5FU-PRO) promoveu redução do processo inflamatório, denotando estabilização da doença periodontal; que o tratamento com RAR (grupo 5FU-RAR) reduziu o volume do infiltrado inflamatório

mostrando sinais de reparação e a associação PRO-RAR (grupo 5FU-RAR-PRO) evidenciou nítida reestruturação tecidual aos 15 dias e menor área de reabsorção óssea aos 30 dias. Observou-se na análise histométrica que a POA foi maior no grupo 5FU-PRO em relação ao grupo SS aos 30 dias ($p<0,05$); a PTO foi maior no grupo 5FU-RAR-PRO aos 30 dias em comparação aos grupos EP, SS, 5FU e 5FU-PRO ($p<0,05$) e a POV foi maior no grupo 5FU-RAR-PRO em comparação ao grupo 5FU aos 7 dias, e maior aos 30 dias em comparação a todos os grupos experimentais ($p<0,05$). Não houve diferença entre os grupos e períodos na imunomarcagem das células TRAP positivas. A RANKL mostrou alto padrão de imunomarcagem nos grupos PE, SS e 5FU em todos períodos, e aos 7 dias no grupo 5FU-PRO, 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO, moderado padrão de imunomarcagem nos grupos 5FU, 5FU-PRO, 5FU-RAR, e 5FU-RAR-PRO, mantendo-se baixo padrão neste último grupo, no período de 30 dias. Houve baixo padrão de imunomarcagem de OPG em todos os grupos e períodos, exceto no grupo 5FU-RAR-PRO que mostrou moderado padrão. Diante dos resultados obtidos pode ser concluído que o uso do quimioterápico 5FU agravou a PE; que o uso do *Saccharomyces cerevisiae* associado à RAR, minimizou os efeitos do quimioterápico nos tecidos periodontais reduzindo o processo inflamatório, e reduzindo a porcentagem de destruição de tecido ósseo na área de furca em animais imunossuprimidos.

Palavras-chave: Imunossupressão. Doença periodontal. Ratos. Quimioterapia. Fluoruracila. Probióticos.

ROCHA, T. E. **Effects of the probiotic *Saccharomyces Ceveriseae* in the treatment of experimental periodontitis in rats undergoing chemotherapy.** 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effects of using probiotic (PRO) *Saccharomyces ceveriseae* as an adjuvant of scaling and root planing (SRP) in the treatment of experimental periodontitis (EP) induced in immunosuppressed animals with chemotherapeutic 5-Fluorouracil (5FU). One hundred and eight animals were submitted to EP induction by installing a cotton thread around the lower left or right first molar. Immunosuppression was obtained by intraperitoneal injection of 5FU applied in two moments: at the time of installing the ligature and after 48 hours. Seven days after installation, the ligature was removed and the animals were randomly separated into six experimental groups that received the following treatments: EP (n = 18) - animals that did not receive any systemic or local treatment; SS (n = 18) - animals that did not receive local treatment, only systemic treatment with saline solution (SS); 5FU (n = 18) - animals treated systemically with 5FU that did not receive any local treatment; 5FU-PRO (n = 18) - animals treated systemically with 5FU that received local irrigation with 0.6 ml of PRO; 5FU-SRP (n = 18) - animals treated systemically with 5FU that received RAR and; 5FU-SRP-PRO (n = 18) - animals treated systemically with 5FU, which received treatment with SRP and local irrigation with 0.6 ml of PRO. Six animals from each period were euthanized at 7, 15 and 30 days after treatments. The specimens containing the interested area were obtained and processed for histopathological, histometric analysis of alveolar bone loss (ABL), percentage of bone tissue (PBT), percentage of vital bone (PVB) and percentage of non-vital bone (PNVB), and immunohistochemical analysis (TRAP, RANKL and OPG). The data obtained were subjected to statistical analysis ($\alpha = 5\%$). The histological results showed that in the specimens treated with 5FU there was worsening of bone loss in the furcation region compared to healthy animals (EP and SS groups); that treatment with PRO as monotherapy (group 5FU-PRO) reduced the inflammatory process, denoting stabilization of periodontal disease; that treatment with SRP (5FU-SRP group) reduced the volume of the inflammatory infiltrate showing signs of repair and the PRO-SRP association (5FU-SRP-PRO group) showed a clear tissue restructuring at 15 days and

a smaller area of bone resorption at 30 days. It was observed in the histometric analysis that ABL was higher in the 5FU-PRO group compared to SS group at 30 days ($p < 0.05$); PTO was higher in 5FU-SRP-PRO group at 30 days compared to EP, SS, 5FU and 5FU-PRO groups ($p < 0.05$) and PVB was higher in the 5FU-SRP-PRO group compared to 5FU group at 7 days, and greater at 30 days compared to all experimental groups ($p < 0.05$). There was no difference between groups and periods in the immunostaining of TRAP positive cells. RANKL showed a high immunostaining pattern in the EP, SS and 5FU groups in all periods, and at 7 days in 5FU-PRO, 5FU-SRP and 5FU-SRP-PRO groups, a moderate immunostaining pattern in the 5FU, 5FU-PRO, 5FU-SRP and 5FU-SRP-PRO groups, maintaining a low standard in 5FU-SRP-PRO group, in the period of 30 days. There was a low pattern of OPG immunostaining in all groups and periods, except in 5FU-SRP-PRO group, which showed a moderate pattern. In view of the results obtained, it can be concluded that the use of 5FU chemotherapy has worsened the evolution of EP; that the use of *Saccharomyces cerevisiae* associated with RAR, minimized the effects of chemotherapy on periodontal tissues, reducing the inflammatory process, and reducing the percentage of bone tissue destruction in the furcation area in immunosuppressed animals.

Keywords: Immunosuppression. Periodontal Disease. Rats. Chemotherapy. Fluorouracil. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema ilustrando o delineamento experimental do estudo e os procedimentos experimentais realizados em seus respectivos intervalos de tempo nos diferentes grupos. Símbolos e abreviaturas: SS, solução salina; 5FU, 5-Flourouracil; RAR, Raspagem e Alisamento Radicular; PRO, probiótico; círculo azul, tratamento sistêmico com SS ou 5FU; triângulo vermelho, sessão de RAR; triângulo verde, sessões de PRO.

52

FIGURA 2 – Gráficos indicando a mediana, primeiro e terceiro quartis da intensidade da resposta inflamatória (A), extensão do processo inflamatório (B) e da reabsorção radicular externa (cimento e dentina) (C) na região de furca do primeiro molar inferior de acordo com os grupos e períodos experimentais. Símbolos: *, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo PE no mesmo período experimental; †, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo SS no mesmo período experimental; ‡, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU no mesmo período experimental; ¶, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-RAR no mesmo período experimental; α, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-PRO no mesmo período experimental; β, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 7 dias do mesmo grupo experimental; μ, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 15 dias do mesmo grupo experimental.

53

FIGURA 3 - Gráficos indicando a mediana, primeiro e terceiro quartis da reabsorção óssea alveolar (A), padrão de estruturação do tecido conjuntivo (B) e do padrão de estruturação do tecido ósseo (C) na região de furca do primeiro molar inferior de acordo com os grupos e períodos experimentais. Símbolos: *, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo PE no mesmo período experimental; †, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo SS no mesmo período experimental; ‡, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU no mesmo período experimental; ¶, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-RAR no mesmo período experimental; α, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-PRO no mesmo período experimental; β, Diferença estatisticamente significativa

em comparação aos 7 dias do mesmo grupo experimental; μ , Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 15 dias do mesmo grupo experimental. **54**

FIGURA 4 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo SS aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; on, espículas de osso necrosado; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 μ m. **55**

FIGURA 5 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: on, espículas de osso necrosado; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 μ m. **55**

FIGURA 6 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU-RAR aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 μ m. **56**

FIGURA 7 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU-PRO aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 μ m. **56**

FIGURA 8 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU-RAR-PRO aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; on, espículas de osso necrosado; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 μ m. **57**

FIGURA 9 - Ilustração da forma de mensuração da área de furca (AF). Delimitação do teto da furca até 2,1mm em limite apical (A), confecção de uma reta perpendicular à linha de demarcação apical (B) e demarcação da área de furca contornando o cimento da região demarcada (C).

58

FIGURA 10 – Gráficos mostrando a média e o desvio padrão (mm²) da perda óssea alveolar (A), porcentagem de tecido ósseo (B), porcentagem de osso vital (C) e porcentagem de osso não vital (D) na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos e períodos experimentais. Símbolos: *, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo PE no mesmo período experimental; †, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo SS no mesmo período experimental; ‡, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU no mesmo período experimental; ¶, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-RAR no mesmo período experimental; α, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-PRO no mesmo período experimental; β, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 7 dias do mesmo grupo experimental; μ, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 15 dias do mesmo grupo experimental.

59

FIGURA 11 - Gráfico com distribuição das médias e desvio padrão das células TRAP-positivas na região de furca dos primeiros molares com periodontite experimental, em cada grupo e período.

60

FIGURA 12 - Fotomicrografias evidenciando a imunomarcação para TRAP na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental aos 7 dias nos grupos PE (A), SS (B), 5FU (C), 5FU-PRO (D), 5FU-RAR (E) e 5FU-RAR-PRO (F). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; setas, osteoclastos. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm.

60

FIGURA 13 - Fotomicrografias da região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a imunomarcação para RANKL nos grupos 5FU (A), 5FU-PRO (B) e 5FU-RAR-PRO (C) aos 7 dias e, para OPG nos grupos 5FU (D), 5FU-PRO (E), e 5FU-RAR-PRO (F) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; setas, células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm.

61

LISTA DE ABREVIATURAS

< =	Menor
≤ =	Menor ou igual
> =	Maior
± =	Mais ou menos
°C =	Graus Celsius
µm =	Micrômetros
5FU =	5-flourouracil
% =	Porcentagem
AM =	Amazonas, Brasil
ANOVA=	Análise de Variância
OA=	Osso alveolar
aPDT =	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
CEUA =	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm ² =	Centímetros quadrados
EDTA =	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA =	Estados Unidos da América
FOA =	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g =	Gramas
HE =	Hematoxilina-eosina
mg/Kg =	Miligramas por quilograma
ml =	Mililitros
mm =	Milímetros
mm ² =	Milímetros quadrados
MO =	Missouri, EUA
Nº =	Número
OPG =	Osteoprotegerina
PBS =	Tampão fosfato salino
PE =	Periodontite experimental
pH =	Potencial hidrogeniônico
POA =	Perda óssea alveolar
PRO =	Probiótico
RANKL =	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-β

RAR =	Raspagem e alisamento radicular
SP =	São Paulo, Brasil
SS=	Solução salina
tc =	Tecido conjuntivo
to =	Tecido ósseo
TRAP=	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UNESP =	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
vs =	Vasos sanguíneos
x =	Veze

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Delineamento experimental.....	24
3.1.2 Anestesia	24
3.1.3 Indução da Periodontite Experimental.....	24
3.1.4 Grupos experimentais	25
3.1.5 Tratamento sistêmico com 5FU e SS	25
3.1.6 Raspagem e alisamento radicular	25
3.1.7 Tratamentos com Probiótico	26
3.1.8 Eutanásia e obtenção das amostras.....	26
3.2 Processamento histológico das amostras	26
3.3 Análise dos resultados	28
3.3.1 Análises histológicas.....	28
3.3.1.1 Análise histológica dos tecidos periodontais	28
3.3.1.2 Análise histométrica da Perda Óssea Alveolar (POA), Porcentagem de Tecido Ósseo (PTO), Porcentagem de Osso Vital (POV) e Porcentagem de Osso Não Vital (PONV) na área de furca	29
3.3.1.3 Análise Imunoistoquímica	30
3.3.2 Calibração do examinador	31
3.3.3 Análise estatística.....	31
4.1 Análise histológica dos tecidos periodontais.....	32
4.1.1 Análise semi-quantitativa intra e inter-grupo.....	32
4.1.2 Análise histológica qualitativa dos grupos em cada período de avaliação	33
4.3 Análise imunoistoquímica (RANKL, OPG e TRAP)	37
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
FIGURAS.....	53
ANEXOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Uma recente publicação sobre a incidência de câncer no mundo, com base no Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), estimou mais de 18 milhões de casos de câncer em 2018 (BRAY *et al.*, 2018). Essa incidência e a mortalidade causada pelas doenças neoplásicas ainda estão crescendo rapidamente em todo o planeta (BRAY *et al.*, 2018). Estima-se que o número de novos casos por ano até 2040 ultrapasse a marca de 27 milhões, número 50% maior quando comparado com novos casos em 2018 (WILD *et al.*, 2020). Por outro lado, a National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) revelou que 46% da população adulta dos Estados Unidos (67 milhões) são portadoras de periodontite (EKE *et al.*, 2015). Muitos destes indivíduos com diagnóstico de periodontite também apresentam algum tipo de neoplasia maligna, sendo importante a atenção dos pesquisadores e clínicos em relação aos efeitos dos tratamentos oncológicos nesses pacientes.

O tratamento oncológico envolve procedimento cirúrgico, radioterápico, quimioterápicos ou a associação destes (GARCIA *et al.*, 2015). Dentre os quimioterápicos utilizados, o 5-Fluorouracil (5FU) tem o seu uso indicado. Esse medicamento atua como antimetabólito do tipo análogo da pirimidina que tem amplo espectro de ação e é utilizado com frequência contra tumores sólidos no trato gastrointestinal, ovário, fígado, cérebro e mama (ARIAS, 2008). A ação do 5FU sobre o DNA e o RNA promove toxicidade e morte celular (ARIAS, 2008; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; NOORDHUIS *et al.*; 2004; WISNIEWSKA-JAROSINSKA *et al.*, 2011). Drogas que afetam a síntese de DNA, como o 5FU, promovem efeitos colaterais que, na cavidade oral, mostram-se mais pronunciados em razão da rápida renovação do epitélio oral (NAIDU *et al.*, 2004). O epitélio, por ser um tecido com rápida proliferação, pode ter sua renovação comprometida pela ação desse quimioterápico, favorecendo a penetração e contaminação dos tecidos mais profundos, incluindo os que compõem o periodonto de inserção (GARCIA *et al.*, 2015).

Algumas complicações na cavidade oral relacionados à quimioterapia por 5FU tem sido demonstradas, como a mucosite e xerostomia (LALLA; SAUNDERS; PETERSON, 2014; SONIS, 2004). Estudos *in vitro* tem demonstrado que o 5FU pode bloquear a proliferação de osteoblastos e induzir sua apoptose (XIAN *et al.*, 2006)

podendo também afetar o sistema RANK-RANKL-OPG, um dos maiores reguladores do metabolismo ósseo, o qual resulta em reflexo sobre as células clásticas, TRAP-positivas (RAGHU NADHANAN *et al.*, 2012) capaz de promover a reabsorção óssea.

A periodontite é definida como uma doença crônica multifatorial que tem como característica a destruição dos tecidos de suporte dentário (PAPAPANOU *et al.*, 2018). Essa doença se desenvolve em resposta à presença de bactérias e suas toxinas (FRANCO *et al.*, 2014) gerando um processo imune-inflamatório influenciado por fatores locais e sistêmicos e pela resposta imune do hospedeiro, induzindo a destruição dos tecidos periodontais (ANDERSEN, LOEBE; HAMMND, 2007). A influência do 5FU nos tecidos periodontais foi avaliada em estudos recentes em animais (GARCIA *et al.* 2015; THEODORO *et al.*, 2016, 2017; GUSMAN *et al.*, 2019), os quais demonstraram que essa droga exacerba a inflamação periodontal e agrava a progressão da periodontite experimental (PE) em ratos. Portanto, terapias que sejam efetivas e seguras no tratamento da periodontite em indivíduos que são submetidos à quimioterapia com 5FU se fazem necessárias e requerem estudos para comprovação de sua eficácia.

O tratamento padrão da periodontite consiste no controle ou na diminuição da microbiota subgengival patogênica por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR; SMILEY *et al.*, 2015). Entretanto, relatos da literatura atestaram que esta terapia pode se mostrar falha devido à dificuldade de acesso em alguns sítios dentários específicos como as áreas de furca e depressões radiculares, além da presença desses microorganismos no interior dos tecidos moles (AOKI *et al.*, 2004). Considerando estas limitações, métodos adjuvantes ao tratamento periodontal convencional, que promovam a eliminação de patógenos periodontais tem sido investigados em estudos em animais e clínicos em humanos, como o uso de antibióticos locais ou sistêmicos e agentes antimicrobianos (LIAW; MILLER; NIMMO, 2019; MORALES *et al.*, 2021; THEODORO *et al.*, 2018); laser de alta e baixa potência (AYKOL *et al.*, 2011; GOKHALE *et al.*, 2012; ISHIKAWA *et al.*, 2009; THEODORO *et al.*, 2017), terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT; GARCIA *et al.*, 2014; IVANAGA *et al.*, 2019; LONGO *et al.*, 2019; NUERNBERG *et al.*, 2020; THEODORO *et al.*, 2012; THEODORO *et al.*, 2018) e jateamento da superfície radicular com jato de ar/glicina (ZHANG *et al.*, 2020). Algumas dessas terapias como a fotobiomodulação com uso dos lasers de baixa potência e a aPDT foram testadas em animais imunossuprimidos

com o 5FU pelo nosso grupo de pesquisa e demonstraram resultados promissores (LONGO *et al.*, 2019; THEODORO *et al.*, 2016, 2017).

Por outro lado, no final da década passada surgiram trabalhos delineando a possibilidade de uso de microrganismos benéficos, denominados de probióticos, como terapia adjuvante ao tratamento periodontal (ALLAKER; DOUGLAS, 2009; STAMATOVA; MEURMAN, 2009). Probióticos são definidos como “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada confere benefícios na saúde do hospedeiro” (HILL *et al.*, 2014). Estudos em humanos, em sua maioria, avaliaram os aspectos clínicos e microbiológicos do uso dos probióticos em diferentes condições, como na gengivite (KRASSE *et al.*, 2006; MAYANAGI *et al.*, 2009; SHIMAUCHI *et al.*, 2008; STAAB *et al.*, 2009) e na periodontite (DELLA RICCIA *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2003; MATSUOKA *et al.*, 2006; MAYANAGI *et al.*, 2009; SUGANO *et al.*, 2007; VICARIO *et al.*, 2013; VIVEKANANDA; VANDANA; BHAT, 2010). Também experimentos em animais tem sido publicados, porém são escassos e utilizaram animais sistemicamente saudáveis (FOUREAUX *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2016; HILLMAN; SHIVERS, 1988; MESSORA *et al.*, 2013; NACKAERTZ *et al.*, 2008; TEUGHELIS *et al.*, 2007). Estes estudos avaliaram diferentes microorganismos probióticos (*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius* WB21, *Bacillus subtilis*-E-300, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*) e demonstraram benefícios do uso de probióticos, porém os resultados relatados não são conclusivos. Um estudo recente de nosso grupo de estudo avaliou o efeito do *L. reuteri* usado sistemicamente no tratamento da PE em animais imunossuprimidos, e apresentou resultados promissores no controle da inflamação dos tecidos periodontais em ratos (MIESSI *et al.*, 2020).

Apenas um trabalho avaliou o *Saccharomyces cerevisiae* como coadjuvante local no tratamento da periodontite experimental em animais e mostrou benefícios na perda óssea e na diminuição da inflamação local em ratos sistemicamente saudáveis (GARCIA *et al.*, 2016). Esse probiótico trata-se de uma levedura que possui β -glucanos em sua parede celular (GARCIA *et al.*, 2016). Esse composto consiste em polissacarídeos que tem a capacidade de ativar leucócitos, estimulando a atividade fagocítica e a produção de citocinas inflamatórias (GARCIA *et al.*, 2016).

Deste modo, a proposta da atual pesquisa considerou que essas características do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* poderia minimizar os efeitos da quimioterapia nos tecidos periodontais e/ou acrescentar benefícios juntamente com a RAR no tratamento da PE em ratos imunossuprimidos.

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos locais do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* como monoterapia ou como terapia coadjuvante à RAR no tratamento da PE em ratos imunossuprimidos com 5-fluorouracil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Cento e oito ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com peso corporal de 180 a 220 g foram utilizados no presente estudo. Os animais apresentavam-se saudáveis e em condições de receber os procedimentos operatórios. Esses animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 4 animais cada e em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), recebendo alimentação com ração e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Parecer n. 00191-2013; Anexo A) e seguiu as normas do ARRIVE Guidelines (KILKENNY *et al.*, 2010; Anexo B).

3.1 Delineamento experimental

3.1.2 Anestesia

Inicialmente os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico e droga quimioterápica a serem administrados. Para todos os procedimentos experimentais (instalação da ligadura, remoção da ligadura e tratamentos locais com RAR e/ou probiótico) os animais foram submetidos à anestesia geral por injeção intramuscular da associação de 70 mg/kg de peso corporal de Cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA) e 6 mg/Kg de peso corporal de Cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil).

3.1.3 Indução da Periodontite Experimental

A periodontite experimental (PE) foi induzida por meio da instalação de um fio de algodão (Corrente, algodão 24, Coats Corrente, São Paulo. Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores, distribuídos randomicamente entre o lado direito e esquerdo. A ligadura foi mantida durante 7 dias em posição subgengival por meio de nós cirúrgicos (GARCIA *et al.*, 2014).

3.1.4 Grupos experimentais

Após 7 dias de instalada, a ligadura foi removida e os animais separados aleatoriamente, seguindo uma tabela gerada em computador, em grupos de acordo com os seguintes tratamentos realizados, conforme apresentado na Figura 1: **PE (n=18)** - animais sistemicamente saudáveis que não sofreram nenhum tratamento sistêmico ou local; **SS (n=18)** - animais sistemicamente saudáveis que não sofreram tratamento local, apenas tratamento sistêmico com solução salina (SS); **5FU (n=18)** - animais tratados sistemicamente com 5FU que não sofreram nenhum tratamento local; **5FU-PRO (n=18)** - animais tratados sistemicamente com 5FU que receberam irrigação local com 0,6 ml do probiótico (PRO) *Saccharomyces cerevisiae*; **5FU-RAR (n=18)** - animais tratados sistemicamente com 5FU que receberam RAR e; **5FU-RAR-PRO (n=18)** - animais tratados sistemicamente com 5FU, que receberam tratamento com RAR e irrigação local com 0,6 ml do PRO *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.5 Tratamento sistêmico com 5FU e SS

O tratamento sistêmico com 5FU (50 mg/mL; Laboratório Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil) consistiu na injeção intraperitoneal de 80 mg/Kg de peso corporal do animal no dia da instalação da ligadura e 40 mg/Kg, 48 horas após (MIESSI *et al.*, 2020; THEODORO *et al.*, 2017) nos grupos 5FU, 5FU-RAR, 5FU-PRO e 5FU-RAR-PRO. O tratamento sistêmico com SS (grupo SS) foi realizado nas mesmas condições do 5FU, sendo aplicado 0,5 ml de solução salina fisiológica para cada animal, nos dois momentos (no dia da instalação da ligadura e 48 horas após).

3.1.6 Raspagem e alisamento radicular

A RAR foi realizada com curetas manuais mini-five 1-2 (Hu-Friede Co. Inc., Chicago, IL, USA) através de 10 movimentos curtos de tração no sentido disto-mesial, na face vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusal (GARCIA *et al.*, 2014). Os procedimentos de RAR foram realizados por um mesmo operador treinado (TER) nos grupos 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO.

3.1.7 Tratamentos com Probiótico (PRO)

Para o tratamento local com PRO, foi utilizado a solução de PRO *Saccharomyces cerevisiae* - CEPA Fração 1972 (Florax® - SM, Hebron Farmacêutica – Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda, Caruaru, PE, Brasil) aplicado em três momentos: imediatamente após remoção da ligadura (grupo 5FU-PRO) ou após a RAR (grupo 5FU-RAR-PRO), 48 e 96 horas após a remoção da ligadura. Cada aplicação local consistiu na deposição de 0,6 ml (60 milhões de células), de forma lenta na interface gengiva marginal – parede radicular por intermédio de seringa (1 ml) e agulha (13 mm x 4,5 mm) para insulina sem bisel (GARCIA *et al.*, 2016). Da mesma forma no grupo RAR foi feita a deposição de 0,6 ml solução salina para controle negativo. No momento da aplicação do PRO, foi confeccionado um tampão de algodão individual, que foi posicionado na garganta do animal para evitar a deglutição da suspensão.

3.1.8 Eutanásia e obtenção das amostras

Concluído o protocolo experimental, seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia por meio de aplicação intramuscular de dose letal de Tiopental (150 mg/kg) aos 7, 15 e 30 dias após realização dos tratamentos. As hemimandíbulas foram dissecadas e fixadas em formaldeído 4% em solução tamponada de 0,1 M, durante 48 horas, para posterior processamento laboratorial.

3.2 Processamento histológico das amostras

Os espécimes foram submetidos à desmineralização em solução de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) a 10% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) durante 8 semanas. Após finalização do processamento e inclusão, cortes semi-seriados com 4 µm de espessura foram obtidos no sentido méso-distal. Para as análises histopatológica e histométrica as secções histológicas foram submetidas à coloração pela técnica da hematoxilina-eosina (HE).

Já para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em xilol e hidratação em série decrescente de etanol.

Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 0,1 M, pH 7,4 (Diva decloaker®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a uma temperatura de 95°C, durante 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. Três lâminas contendo três cortes selecionadas para imunoistoquímica de cada animal foram incubados com um dos seguintes anticorpos primários policlonais: Osteoprotegerina (OPG; Goat anti-opg –Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; SC 8468), Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP; Goat anti-trap – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; SC 30833) e Receptor ativador de NF-Kappa B ligante (RANKL; Goat anti-rankl – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; SC 7628).

Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato de sódio, pH 7,4, 0.1 M, acrescido de albumina de soro bovino a 3% (Albumina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os cortes histológicos foram tratados para bloqueio da peroxidase endógena empregando peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos. A seguir foram incubados com um dos anticorpos primários (OPG, RANKL ou TRAP), em temperatura ambiente, durante 18 a 24 horas. Uma segunda incubação foi realizada com anticorpo secundário (Anticorpo secundário biotinilado universal, K 0690, DAKO – Carpinteria, CA, EUA; anti-camundongo, anti-cabra e anti-coelho), em temperatura ambiente, durante 1 hora. Uma terceira incubação foi realizada com uma solução contendo estreptavidina conjugada com peroxidase, em temperatura ambiente, durante 1 hora. A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada com tampão de revelação DAB-Substrato (DAB-Substrato, K 3468, DAKO, Carpinteria, CA, EUA.), e diaminobenzidina DAB- Cromógeno (DAB- Cromógeno, K 3468, DAKO, Carpinteria, CA, EUA.), em temperatura ambiente, durante 10 a 60 segundos. Os cortes histológicos foram submetidos à contra-coloração pela hematoxilina. Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão dos anticorpos primários (GARCIA *et al.*, 2014).

3.3 Análise dos resultados

3.3.1 Análises histológicas

A análise histológica foi feita em microscopia de luz, por um histologista certificado (EE), calibrado e cego aos tratamentos. As imagens foram capturadas por câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador.

3.3.1.1 Análise histológica dos tecidos periodontais

Foi realizada análise semi-quantitativa (MIESSI *et al.*, 2020) utilizando escores (que variaram da menor para a maior alteração) por um histologista certificado e cego aos tratamentos (EE) e os seguintes parâmetros e características dos tecidos foram avaliados:

- 1) **intensidade da resposta inflamatória local**: escore 0 – ausência de inflamação; escore 1 – pequena quantidade de células inflamatórias; escore 2 – moderada quantidade de células inflamatórias; escore 3 – grande quantidade de células inflamatórias;
- 2) **extensão do processo inflamatório**: escore 0 – ausência de inflamação; escore 1 – estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca; escore 2 – estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca; escore 3 – estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca;
- 3) **reabsorção radicular externa** (cimento e dentina): escore 0 – ausente; escore 1 – apenas área reabsorvidas inativas; escore 2 – poucas áreas de reabsorção ativas; escore 3 – muitas áreas de reabsorção ativas;
- 4) **reabsorção óssea alveolar**: escore 0 – dentro dos padrões de normalidade; escore 1 – pequena quantidade de áreas de reabsorção; escore 2 – moderada quantidade de áreas de reabsorção; escore 3 – grande quantidade de áreas de reabsorção;
- 5) **padrão de estruturação do tecido conjuntivo na área de furca**: escore 0 – moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas com tecido conjuntivo denso; escore 1 – moderada quantidade tanto de

fibroblastos quanto de fibras colágenas; escore 2 – pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas e edema intersticial; escore 3 – desestruturação tecidual severa com edema intersticial e áreas de necrose;

- 6) ***padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca:*** escore 0 – trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea; escore 1 – trabéculas ósseas de contorno irregular recobertas tanto por muitos osteoblastos quanto por osteoclastos ativos; escore 2 – trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos; escore 3 – áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos.

Como complementação dos dados também foi realizada uma análise qualitativa das características histológicas da área de furca dos molares inferiores, de cada espécime em cada grupo e período por um histologista certificado e cego aos tratamentos (EE).

3.3.1.2 Análise histométrica da Perda Óssea Alveolar (POA), Porcentagem de Tecido Ósseo (PTO), Porcentagem de Osso Vital (POV) e Porcentagem de Osso Não Vital (PONV) na área de furca

Um examinador calibrado e cego aos tratamentos efetuados realizou as análises histométricas (TER). Foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha) para se mensurar a área de POA em mm², a PTO, POV e PONV em porcentagem. Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram selecionados para análise histométrica. Esta seleção foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento efetuado (TER).

A área da POA foi delimitada contornando toda a superfície do cimento entre a crista óssea e o teto da furca (GARCIA *et al.*, 2014). A análise da PTO, POV e PONV foi adaptado de Garcia *et al.* (2015). Para essas análises, primeiramente foi mensurada a área de furca (AF), a área de tecido ósseo (ATO), a área de tecido ósseo vital (TOV) e área de tecido ósseo não vital (TONV) na área de furca, todas em mm². A AF foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada do centro do teto da furca

seguindo 2,1 mm em direção apical. A partir desse ponto foi traçado duas linhas retas perpendiculares à primeira, em direção ao cimento das raízes mesial e distal. A partir desse ponto, a linha de contorno seguiu toda a superfície externa do cimento localizado entre as raízes. A ATO teve o mesmo limite apical da AF e, a partir desse limite seguiu toda a superfície externa do osso alveolar entre as raízes. A TOV e TONV seguiram o mesmo padrão de mensuração, porém delimitando a área de tecido ósseo vital ou não vital entre as raízes. A PTO, POV e PONV na região de furca foi calculada multiplicando a ATO, TOV ou TONV consecutivamente por 100 e dividindo pela AF ($PTO = [ATO \times 100] / AF$; $POV = [TOV \times 100] / AF$; $PONV = [TONV \times 100] / AF$; adaptado de GARCIA *et al.*, 2015). A POA, PTO, POV e PONV de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador (TER), em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados.

3.3.1.3 Análise Imunoistoquímica

Um examinador treinado e cego aos tratamentos (ML) selecionou uma lâmina histológica com 3 cortes semi-seriados de cada um dos biomarcadores (TRAP, RANKL e OPG) de cada espécime. A imunomarcacão foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citosólico das células positivas.

A análise quantitativa da imunomarcacão para TRAP foi realizada por um examinador cego aos tratamentos e calibrado (ML) por meio da contagem de células TRAP-positiva localizadas no centro do septo interradicular do primeiro molar inferior de uma área de 1000µm x 1000µm, com um aumento de 200x (GARCIA *et al.*, 2014) em três cortes histológicos equidistantes. O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 1000µm (GARCIA *et al.*, 2014).

Análises semiquantitativas da imunomarcacão para RANKL e OPG foi efetuada na área de furca com um aumento de 400x por um histologista certificado e cego aos tratamentos (EE). O estabelecimento dos escores da imunomarcacão foi baseado em Garcia *et al.* (2014): escore 0 – ausência de imunomarcacão (ausência total de células-imunorreativas - IR); escore 1 - baixo padrão de imunomarcacão (1/4 das células-IR); escore 2 - moderado padrão de imunomarcacão (1/2 das células-IR)

e escore 3 - alto padrão de imunomarcação (3/4 das células IR). Os escores de RANKL e OPG foram individualmente analisados em cada grupo experimental.

3.3.2 Calibração do examinador

Previamente à realização das análises histométricas e imunoistoquímica de TRAP, os examinadores (TER e ML) foram treinados através da dupla mensuração de 24 espécimes, com o intervalo de 1 semana. O teste Kappa mostrou um alto grau de concordância (94%) entre os dois momentos de mensuração de todas as análises.

3.3.3 Análise estatística

O cálculo da amostra foi realizado considerando a PTO na região de furca como desfecho primário. O desfecho secundário foi descrito pelo padrão de imunomarcação e as características histológicas na área de furca. Considerando a diferença mínima de 4% entre as médias do tratamento e o desvio padrão de 1,3% da PTO, os resultados mostraram um tamanho de amostra de 4 animais ($\alpha = 0,05$) com poder de estudo de 95% (Bioestat; Versão 5.3, Bioestat, Instituto Mamirauá, Manaus, Brasil). Considerando uma perda de animais e baseado em estudos com metodologia semelhante, foi utilizado 6 animais por período experimental (GARCIA *et al.*, 2015; MIESSI *et al.*, 2020)

A análise estatística dos dados foi realizada com o software Bioestat (Versão 5.3, Bioestat, Instituto Mamirauá, Manaus, Brasil), com 5% de nível de significância. A normalidade dos dados histométricos (POA, PTO, POV e PONV) e imunoistoquímico (TRAP) foi analisada usando o teste de Shapiro Wilk. As análises intra e intergrupo foram feitas com análise de variância (ANOVA; $p < 0,05$). Quando o ANOVA detectou uma diferença significativa, foram feitas comparações múltiplas usando o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados semi-quantitativos da análise histológica dos tecidos periodontais foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls quando detectada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica dos tecidos periodontais

4.1.1 Análise semi-quantitativa intra e inter-grupo

Os dados da análise histopatológica estão apresentados nas Figuras 2 a 8. O grupo 5FU apresentou maior intensidade da resposta inflamatória local na região de furca em comparação ao grupo 5FU-PRO aos 15 dias ($p<0,05$), em comparação aos grupos EP, SS e 5FU-RAR-PRO aos 15 e 30 dias e em relação ao grupo 5FU-RAR aos 30 dias ($p<0,05$). O grupo 5FU-RAR obteve maior intensidade da resposta inflamatória em relação aos grupos EP, SS, 5FU-PRO e 5FU-RAR-PRO aos 15 dias ($p<0,05$). Aos 30 dias, os grupos 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO apresentaram menor intensidade da resposta inflamatória em relação ao grupo 5FU-PRO ($p<0,05$). Em uma análise intragrupo, o grupo 5FU-RAR aos 30 dias apresentou menor intensidade da resposta inflamatória em comparação aos 7 e 15 dias ($p<0,05$). Já o grupo 5FU-RAR-PRO apresentou, aos 7 dias, maior intensidade da resposta inflamatória em relação aos 15 e 30 dias ($p<0,05$), e o grupo 5FU-PRO teve menor intensidade aos 15 dias comparado aos 7 e 30 dias ($p<0,05$; Figura 2).

Já em relação à extensão do processo inflamatório, observou-se que o grupo 5FU apresentou maior extensão em comparação a todos os grupos experimentais aos 15 e 30 dias ($p<0,05$). Em uma análise intragrupo, o grupo 5FU-RAR, 5FU-PRO e 5FU-RAR-PRO apresentaram maior extensão do processo inflamatório aos 7 dias em comparação aos 15 e 30 dias ($p<0,05$; Figura 2).

O grupo 5FU apresentou maior reabsorção radicular externa (cimento e dentina) em comparação a todos os grupos experimentais aos 7 dias. Em uma análise intragrupo, o grupo 5FU apresentou maior reabsorção radicular aos 7 dias em comparação aos 30 dias ($p<0,05$; Figura 2).

Quanto à reabsorção óssea na região de furca, o grupo 5FU apresentou maior reabsorção em comparação ao grupo 5FU-PRO em todos os períodos experimentais ($p<0,05$), e em comparação aos grupos 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO aos 30 dias ($p<0,05$). O grupo 5FU-PRO apresentou menor reabsorção óssea em relação ao grupo 5FU-RAR aos 7 e 15 dias ($p<0,05$), e em comparação ao grupo 5FU-

RAR-PRO aos 7 dias ($p<0,05$). Já em uma análise intragrupo foi observado que nos grupos 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO essa reabsorção foi maior aos 7 dias em comparação aos 30 dias ($p<0,05$; Figura 3).

O padrão de estruturação do tecido conjuntivo na região de furca foi pior nos grupos PE e SS em comparação ao grupo 5FU-PRO aos 7 dias ($p<0,05$) e em comparação aos grupos 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO aos 30 dias ($p<0,05$). O grupo 5FU apresentou pior padrão de estruturação do tecido conjuntivo em comparação ao grupo 5FU-PRO aos 7 e 15 dias ($p<0,05$), e em comparação ao grupo 5FU-RAR aos 15 e 30 dias ($p<0,05$), e em comparação ao grupo 5FU-RAR-PRO aos 30 dias ($p<0,05$). O grupo 5FU-PRO apresentou melhor padrão de estruturação do tecido conjuntivo em comparação ao grupo 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO aos 7 dias ($p<0,05$) e pior em comparação ao grupo 5FU-RAR-PRO aos 30 dias ($p<0,05$). Em uma análise intragrupo, o grupo 5FU-RAR apresentou pior estruturação do tecido conjuntivo na região de furca aos 7 dias em comparação aos 15 e 30 dias ($p<0,05$), e o grupo 5FU-RAR-PRO apresentou melhor estruturação aos 30 dias em comparação aos 7 e 15 dias ($p<0,05$; Figura 3).

Em relação ao padrão de estruturação do tecido ósseo na região de furca, o grupo 5FU apresentou pior estruturação em comparação ao grupo 5FU-RAR-PRO aos 15 e 30 dias ($p<0,05$) e em comparação aos grupos PE, 5FU-RAR e 5FU-PRO aos 30 dias ($p<0,05$). Na análise intragrupo, esse padrão de estruturação foi melhor aos 30 dias em relação aos 7 dias no grupo 5FU-RAR-PRO ($p<0,05$; Figura 3).

4.1.2 Análise histológica qualitativa dos grupos em cada período de avaliação

O grupo PE aos 7 dias apresentou um intenso infiltrado inflamatório que estava presente em todo o tecido conjuntivo da região de furca. Alguns espécimes deste grupo apresentavam espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias na região de furca. O septo interradicular se mostrou com um contorno bastante irregular e com trabéculas ósseas bastante delgadas, em cuja superfície se observava grande quantidade de osteoclastos ativos. Aos 15 e 30 dias a inflamação ainda era intensa, no entanto, comparativamente houve uma redução no volume ocupado pelo infiltrado inflamatório. O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou uma discreta redução na inflamação, no entanto, com poucos

sinais de reparação tecidual. O septo interradicular se apresentou com trabéculas ósseas delgadas, de contorno externo irregular e com osteoclastos ativos.

Os espécimes do grupo SS mostraram grande semelhança com às do grupo PE. Aos 7 dias, o infiltrado inflamatório mostrava-se intenso em quase a totalidade do tecido conjuntivo da região de furca. Espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias na região de furca também foram observadas em alguns espécimes. O septo interradicular se mostrou irregular e com trabéculas ósseas delgadas em sua maioria, com presença de osteoclastos ativos em sua superfície. Aos 15 e 30 dias a inflamação ainda era intensa, no entanto, porém com redução no volume ocupado pelo infiltrado inflamatório entre os períodos. Houve uma redução discreta da inflamação no tecido conjuntivo próximo ao septo interradicular, com poucos sinais de reparação tecidual. O septo interradicular mostrou trabéculas ósseas delgadas, com osteoclastos ativos e contorno irregular (Figura 4).

No grupo 5FU, em todos os períodos experimentais, observou-se a prevalência da destruição de todos os tecidos periodontais. O tecido conjuntivo da área de furca apresentava-se totalmente desestruturado e com intenso infiltrado inflamatório que atingia a margem do tecido ósseo alveolar do septo interradicular. Em todos os espécimes grandes espículas de osso necrosado, envoltas por grande quantidade de células inflamatórias, estavam presentes. Em alguns espécimes, especialmente aos 30 dias, houve um comprometimento de toda a integridade do septo interradicular e nível de reabsorção óssea se aproximou do osso basal da mandíbula, denotando um aumento da severidade da doença periodontal ao longo do tempo. O tecido ósseo do septo interradicular se mostrou composto por trabéculas ósseas muito irregulares, extremamente delgadas, com amplos espaços medulares, alguns dos quais com presença de moderada quantidade de células inflamatórias. O contorno externo do septo interradicular se apresentou muito irregular, repleto de lacunas de reabsorção e muitos osteoclastos ativos (Figura 5).

Aos 7 dias do grupo 5FU-RAR, havia severa desestruturação tecidual e intenso infiltrado inflamatório que ocupava o tecido conjuntivo da área de furca e margeava o tecido ósseo do septo interradicular. Espículas de osso necrosado estavam presentes em alguns espécimes. O contorno do septo interradicular se mostrou bastante irregular, repleto de osteoclastos ativos e com as trabéculas ósseas muito delgadas. Aos 15 e 30 dias o volume ocupado pelo infiltrado inflamatório sofreu

uma progressiva redução. O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou sinais de reparação, especialmente aos 30 dias. Havia neste tecido uma pequena quantidade de fibras colágenas, muitos fibroblastos, grande número de vasos sanguíneos e uma moderada quantidade de células inflamatórias. As trabéculas ósseas se mostraram com uma espessura moderada, com grande irregularidade na superfície e com muitos osteoclastos em franca atividade (Figura 6).

No grupo 5FU-PRO, aos 7, 15 e 30 dias prevaleceu a desestruturação dos tecidos periodontais na região de furca. Um infiltrado inflamatório que variou de intenso à moderado estava presente em um tecido conjuntivo composto por pequena quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. A constituição deste tecido pouco variou ao longo do tempo, denotando uma estabilização da doença, sem, contudo, haver um aumento de sua severidade. Alguns espécimes apresentavam espículas de osso necrosado, envoltas por grande quantidade de células inflamatórias. O tecido ósseo do septo interradicular se mostrou composto por trabéculas ósseas muito irregulares, extremamente delgadas, com amplos espaços medulares. O contorno externo do septo interradicular se apresentou muito irregular e com muitas lacunas de reabsorção (Figura 7).

Já no grupo 5FU-RAR-PRO a magnitude da resposta inflamatória local se mostrou intensa aos 7 dias e moderada aos 15 dias e 30 dias. Aos 7 dias houve severa desestruturação tecidual, com grande comprometimento da estrutura do tecido conjuntivo e ósseo alveolar, supostamente reflexo do trauma ocasionado pela SRP, todavia o progresso do processo de reparo teve um curso favorável ao longo do tempo. Aos 15 dias observou-se no tecido conjuntivo da região de furca, que embora ainda se apresentasse um grau de inflamação, uma nítida reestruturação tecidual. Neste local constatou-se uma moderada quantidade tanto de fibroblastos como de fibras colágenas, as quais aumentaram consideravelmente aos 30 dias, um reflexo do avanço do processo de reparação. Tanto aos 15 dias quanto aos 30 dias, o osso do septo interradicular exibiu trabéculas ósseas de contorno superficial externo mais regular e com menos áreas de reabsorção óssea ativa (Figura 8).

4.2 Análise histométrica (POA, PTO, POV e PONV) na área de furca

A forma de mensuração da área de furca e os dados das análises histométricas estão apresentados nas Figura 9 e 10. O grupo 5FU-PRO apresentou maior POA em comparação ao grupo SS aos 30 dias ($p<0,05$; Figura 10.A). O grupo EP apresentou maior PTO em relação ao grupo 5FU-RAR-PRO aos 7 dias ($p<0,05$) e em relação aos grupos 5FU, 5FU-RAR e 5FU-PRO aos 7 e 15 dias ($p<0,05$). Ainda aos 7 dias, o grupo 5FU-RAR-PRO apresentou maior PTO em relação ao grupo 5FU-RAR ($p<0,05$). Já aos 30 dias, o grupo 5FU-RAR-PRO apresentou maior PTO em comparação aos grupos EP, SS, 5FU e 5FU-PRO ($p<0,05$). Em uma análise intragrupo, o grupo EP apresentou menor PTO aos 30 dias em comparação aos 7 e 15 dias ($p<0,05$); o grupo SS apresentou menor PTO aos 30 dias em relação aos 7 dias ($p<0,05$) e o grupo 5FU-RAR apresentou maior PTO aos 30 dias em comparação aos 7 dias ($p<0,05$; FIGURA 10.B).

Em relação à POV, os grupos EP e SS apresentaram maior porcentagem em relação ao grupo 5FU-PRO aos 7 dias ($p<0,05$) e em relação aos grupos 5FU e 5FU-RAR aos 7 e 15 dias ($p<0,05$). O grupo 5FU-RAR-PRO apresentou maior POV em comparação ao grupo 5FU aos 7 dias ($p<0,05$), em comparação ao grupo 5FU-RAR aos 7 e 30 dias ($p<0,05$), e em comparação aos grupos EP, SS, 5FU e 5FU-PRO aos 30 dias ($p<0,05$). Os grupos 5FU-RAR e 5FU-PRO tiveram maior POV em comparação ao grupo 5FU aos 30 dias ($p<0,05$). Já em uma análise intragrupo, o grupo EP apresentou menor POV aos 30 dias em comparação aos 7 dias ($p<0,05$); O grupo SS apresentou menor POV aos 30 dias em comparação aos 7 dias ($p<0,05$); o grupo 5FU-RAR apresentou maior POV aos 30 dias em comparação aos 7 dias ($p<0,05$) e o grupo 5FU-RAR-PRO apresentou maior POV aos 30 dias em comparação aos 7 e 15 dias ($p<0,05$; Figura 10.C).

Já a PONV se apresentou menor no grupo 5FU-RAR quando comparado ao grupo SS aos 7 dias ($p<0,05$). Em uma análise intragrupo pode se observar que a PONV foi menor aos 30 dias comparado aos 15 dias no grupo PE ($p<0,05$), e menor aos 30 dias comparado aos 7 dias no grupo SS ($p<0,05$; Figura 10.D).

4.3 Análise imunoistoquímica (RANKL, OPG e TRAP)

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de RANKL, OPG e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica. As células imunorreativas apresentaram uma coloração acastanhada confinada ao compartimento citossólico. A imunomarcação para TRAP estava presente predominantemente em osteoclastos multinucleados. A marcação para RANKL e OPG estava presente predominantemente em osteoclastos.

Os resultados da imunomarcação das células TRAP-positivas estão apresentados nas figuras 11 e 12. Não houve diferença estatisticamente significativa da imunomarcação das células TRAP-positivas entre os grupos, nos diferentes períodos ($P > 0,05$; Figura 11). Para RANKL prevaleceu um padrão alto de imunomarcação aos 7, 15 e 30 dias nos grupos PE e 5FU. Nos grupos 5FU-PRO e 5FU-RAR o padrão de imunomarcação foi predominantemente alto aos 7 dias e moderado aos 15 e 30 dias. O grupo 5FU-RAR-PRO apresentou um padrão de imunomarcação alto aos 7 dias, moderado aos 15 dias e de moderado a baixo aos 30 dias (Figura 13). Para OPG prevaleceu um baixo padrão de marcação aos 7, 15 e 30 dias em todos os grupos experimentais, exceto aos 30 dias em 5FU-RAR-PRO onde a maioria dos espécimes apresentaram um padrão moderado de imunomarcação (Figura 13).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* como monoterapia ou associado à RAR no tratamento da PE em ratos sob condições de imunossupressão pelo uso do quimioterápico 5FU.

O modelo de indução da doença periodontal empregado no presente estudo, com a instalação de uma ligadura ao redor do dente trata-se de método reconhecido na literatura por permitir o acúmulo da placa bacteriana e possibilitar a penetração bacteriana no tecido mole e, conseqüentemente, induzir inflamação e reabsorção óssea alveolar (GRAVES *et al.*, 2008). O rato é o animal mais frequentemente utilizado em estudos de PE pois são de fácil manipulação, de custo reduzido e desenvolve resposta biológica com grande semelhança à do homem (GRAVES *et al.*, 2008; KLAUSEN, 1991). Além disso a anatomia periodontal desse animal possui grande similaridade com o periodonto humano (OZ; PULEO, 2011).

O resultado histológico encontrado nos espécimes do grupo PE aos 7 dias, caracterizado pela presença de um intenso infiltrado inflamatório, presença de espículas ósseas necrosadas, septo ósseo interradicular de aspecto irregular com presença na superfície de osteoclastos ativos, sem sinais de reparação, comprovam a efetividade do método de indução da doença periodontal e corrobora achados de pesquisas anteriores (GARCIA *et al.*, 2011, 2013, 2014; MOLON *et al.*, 2014; THEODORO *et al.*, 2016, 2017; MIESSI *et al.*, 2020).

Os animais que receberam solução salina via sistêmica (grupo SS) apresentaram similaridade nos achados histológicos com os espécimes do grupo PE o que demonstra que o uso sistêmico da solução salina não foi capaz de interferir na progressão da doença periodontal experimental. Tais resultados podem ser justificados pelo nível insuficiente de stress promovido pela manipulação animal para indução da imunossupressão ou aplicação da solução salina, que provavelmente não atingiu nível suficiente para promover alterações na progressão da doença, uma vez que está evidenciado na literatura a influência do stress na doença periodontal (LU *et al.*, 2014; PREEJA *et al.*, 2013).

Nos espécimes tratados somente com o quimioterápico sem tratamento local (grupo 5FU), os resultados demonstraram efeitos indesejáveis desse

medicamento no tecido periodontal acometido pela periodontite experimental, que foram maiores que os observados nos animais dos grupos PE e SS, em todos períodos, caracterizado pela severa destruição dos tecidos periodontais, tecido conjuntivo totalmente desestruturado, apresentando intenso infiltrado inflamatório com grandes espículas de osso necrosado, envoltas por grande quantidade de células inflamatórias. Ainda, em alguns espécimes aos 30 dias, o comprometimento de toda a integridade do septo interradicular e o nível de reabsorção óssea se aproximou do osso basal da mandíbula, denotando um aumento da severidade da doença periodontal ao longo do tempo.

Estes resultados mostraram que o 5FU agrava a periodontite induzida causando, em todos os períodos analisados, grande destruição tecidual, corroborando os achados de Garcia *et al.* (2015). Por ser um quimioterápico, o 5FU é citotóxico para células que possuem um alto índice de proliferação (ARIAS, 2008). Von Bültzingslöwen *et al.* (2001) reportaram que o 5FU provoca degeneração autofágica em queratinócitos da mucosa bucal. Sendo o epitélio juncional periodontal um tecido epitelial especializado composto por queratinócitos que apresentam um alto índice de renovação (PÖLLÄNEN; SALONEN; UITTO, 2003), pode ser inferido que seja também muito afetado pelo 5FU.

Por se tratar da primeira linha de defesa dos tecidos periodontais contra a agressão microbiana (TSUKAMOTO *et al.*, 2012) a ruptura do epitélio juncional facilita a penetração de bactérias e seus subprodutos para o interior dos tecidos periodontais, especialmente aqueles que compõem o periodonto de inserção, contribuindo para agravar a progressão da doença periodontal conforme observado na presente pesquisa.

Os resultados observados nos espécimes tratados com PRO localmente como monoterapia (5FU-PRO) evidenciaram que, mesmo na ausência da instrumentação mecânica, o uso do PRO foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório, apresentando pequena quantidade de fibras colágenas e de fibroblastos, com pouca variação ao longo do tempo, denotando a estabilização da doença periodontal, sem contudo haver um aumento da sua severidade. Assim este tratamento mostrou-se promissor pois reduziu a magnitude da resposta inflamatória local.

Tais fatos devem-se, provavelmente, ao possível efeito local do probiótico sobre a imunidade local ou na modulação da função imunológica sistêmica, na produção de produtos químicos que inibem bactérias orais ou sua possível ação sobre a formação de placa bacteriana, por competir e intervir com bactérias ou até mesmo no envolvimento no metabolismo de substrato (MEURMAN, 2005). Também se acrescenta o fato de que a parede celular do PRO *Saccharomyces cerevisiae* contém β -glucanos, que são polissacarídeos que contém efeito antimicrobiano, baseado em sua capacidade de ativar leucócitos, estimulando a atividade fagocítica e produção de citocinas inflamatórias (XIAO et al., 2004).

Os efeitos benéficos do uso sistêmico do probiótico na doença periodontal também foram relatados por outros estudos, e podem ser justificados pelo menor trauma tecidual se comparado com métodos mecânicos convencionais (FOUREAUX et al., 2014; MESSORA et al., 2013). Estudos clínicos randomizados e controlados mostraram resultados clínicos favoráveis, observados com o uso de probióticos em diferentes condições como na redução da inflamação gengival (DELLA RICCIA et al., 2007; TWETMAN et al., 2009) e na periodontite crônica (DELLA RICCIA et al., 2007; SHIMAUCHI et al., 2008; TSUBARA et al., 2009; VICARIO et al., 2013; VIVEKANANDA; VANDANA; BHAT, 2010).

Na análise dos espécimes tratados com RAR (grupo 5FU-RAR) observa-se que houve aos 7 dias severa desestruturação tecidual e intenso infiltrado inflamatório, com o septo interradicular bastante irregular e repleto de osteoclastos ativos. Nos períodos seguintes houve melhora nestes parâmetros com redução do volume do infiltrado inflamatório e o tecido conjuntivo próximo do septo interradicular com sinais de reparação, especialmente aos 30 dias. Além disso foi observado pequena quantidade de fibras colágenas, muitos fibroblastos, grande número de vasos sanguíneos e uma moderada quantidade de células inflamatórias e trabéculas ósseas com uma espessura moderada, com grande irregularidade na superfície e com muitos osteoclastos em franca atividade. Estes resultados corroboram os achados de outros estudos (GARCIA et al. 2015; THEODORO et al. 2017) e os achados descritos no período de 7 dias se devem, provavelmente a ação traumática dos instrumentos de raspagem sobre os tecidos periodontais já alterados pelo uso do imunossupressor.

Nos espécimes do grupo 5FU-RAR-PRO observou-se que aos 7 dias a magnitude da resposta inflamatória local se mostrou intensa e severa desestruturação

tecidual, com grande comprometimento da estrutura do tecido conjuntivo e ósseo alveolar. Aos 15 dias observou-se no tecido conjuntivo resposta inflamatória moderada que se manteve aos 30 dias demonstrando uma nítida reestruturação tecidual. Ainda havia uma moderada quantidade tanto de fibroblastos como de fibras colágenas, as quais aumentaram consideravelmente aos 30 dias. Tanto aos 15 dias quanto aos 30 dias, o osso do septo interradicular exibiu trabéculas ósseas de contorno superficial externo mais regular e com menos áreas de reabsorção óssea ativa.

Estes fatos demonstram que os achados na fase inicial do processo (7 dias) provavelmente se devem ao efeito traumático do procedimento de RAR, também observado no grupo 5FU-RAR neste período. Também deve ser considerado o possível efeito benéfico do uso associado do probiótico que, cessado o efeito da RAR, pôde controlar o processo inflamatório, contribuindo para a reestruturação tecidual caracterizada pela moderada quantidade de fibroblastos como de fibras colágenas e menor reabsorção ativa e regularidade da superfície óssea, refletindo um avanço do processo de reparação.

De uma forma geral na avaliação histopatológica pode ser inferido que os espécimes tratados com o uso sistêmico de solução salina (grupo SS) não proporcionou danos no processo de reparo da doença periodontal quando comparado com os do grupo PE; que os espécimes tratados somente com o quimioterápico (grupo 5FU) demonstraram maior destruição do tecido ósseo na região da furca que os espécimes não tratados com o quimioterápico (grupos PE e SS); que o uso do probiótico como monoterapia (grupo 5FU-PRO) minimizou os efeitos do quimioterápico em todos os períodos de observação; que o tratamento com RAR (grupo 5FU-RAR) promoveu eventos biológicos favoráveis à reparação e que a associação do uso do probiótico à RAR (grupo 5FU-RAR-PRO) contribuiu para a reestruturação tecidual da doença periodontal influenciada pelo quimioterápico, com maior evidências nos períodos de 15 e 30 dias. Essa observação pode ser justificada pelo fato do tratamento apenas com o probiótico sem a RAR promove menor trauma tecidual (GARCIA *et al.*, 2016), porém os resultados mostram a importância do tratamento periodontal principalmente aos 15 e 30 dias após o tratamento, demonstrando uma aceleração no processo de reparo principalmente quando associado à terapia com PRO em comparação com os outros grupos experimentais.

Com relação à análise histométrica, a PTO foi maior no grupo 5FU-RAR-PRO aos 30 dias em comparação aos grupos PE, SS, 5FU e 5FU-PRO. Esses resultados mostraram que o PRO como adjuvante à RAR no período final de reparação conseguiu estabilizar a PTO na região de furca, que foi menor nos animais sistemicamente saudáveis ou imunossuprimidos com 5FU, que sofreram a indução da PE. Além disso, essa porcentagem ainda se mostrou maior em relação ao grupo tratado apenas com aplicação local de PRO, o que reforça a importância da terapia mecânica na terapia periodontal, corroborando com resultados de estudo prévio com o PRO *Saccharomyces cerevisiae* no tratamento da PE em ratos sistemicamente saudáveis (GARCIA *et al.*, 2016).

A POA foi maior em animais tratados com 5-FU (grupo 5FU-PRO) em relação ao grupo SS aos 30 dias, mostrando que somente o PRO isoladamente, sem a terapia mecânica com RAR não foi capaz de estabilizar a POA em animais imunossuprimidos com 5FU, resultado contrário ao estudo de GARCIA *et al.* (2016), onde os animais sistemicamente saudáveis tratados apenas com PRO *Saccharomyces cerevisiae* localmente, mostrou similaridade da POA com os animais tratados apenas com RAR (GARCIA *et al.*, 2016).

Já em relação à qualidade do tecido ósseo na região de furca, os resultados mostraram uma maior POV no grupo 5FU-RAR-PRO em comparação ao grupo 5FU aos 7 dias, e maior aos 30 dias em comparação a todos os grupos experimentais. Esta observação reforça os achados histológicos de que o probiótico minimizou os efeitos de desestruturação tecidual promovido pelo quimioterápico, promovendo a redução do processo inflamatório e melhora da qualidade do tecido ósseo em nível compatível com um estado sistêmico de normalidade.

Os resultados imunoistoquímicos revelaram que houve baixo padrão de imunomarcagem de OPG e alto padrão de imunomarcagem da RANKL nos grupos PE, SS e 5FU, em todos períodos e, aos 7 dias, nos grupos 5FU-PRO, 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO. Estes achados comprovam a elevada atividade de reabsorção que ocorre no período inicial da PE, conforme relatos de alguns autores (GARCIA *et al.*, 2013, 2014; MOLON *et al.*, 2014), e que o tratamento sistêmico com SS e 5FU não foram capazes de promoverem benefícios à reparação tecidual.

O alto padrão de imunomarcção da RANKL observado aos 7 dias nos espécimes dos grupos 5FU-PRO, 5FU-RAR e no 5FU-RAR-PRO provavelmente se devem ao efeito do quimioterápico, que se encontra ainda elevado neste período, ao dano tecidual provocado pela RAR e que o uso do probiótico não foi capaz de interferir na atividade de reabsorção óssea. Nos períodos de 15 e 30 dias, notou-se moderado padrão de imunomarcção OPG e RANKL nos espécimes dos grupos 5FU-PRO, 5FU-RAR e 5FU-RAR-PRO e baixo padrão de imunomarcção de RANKL nos espécimes do grupo 5FU-RAR-PRO aos 30 dias. Tais fatos podem estar associados provavelmente a evolução do processo de reparo e redução do efeito do quimioterápico nos tecidos periodontais, além de efeitos benéficos do sinergismo da RAR com o uso do PRO.

Não houve diferença estatisticamente significativa na imunomarcção de células TRAP-positivas entre os grupos e períodos experimentais. Esse resultado corrobora com os achados de MIESSI *et al.* (2020) com modelo experimental semelhante, porém utilizando o PRO *Lactobacillus reuteri* como tratamento local (MIESSI *et al.*, 2020). Resultados de GARCIA *et al.*, 2016 mostraram menor número de células TRAP-positivas aos 7 dias nos grupos tratado com RAR ou PRO *Saccharomyces cerevisiae* isoladamente e no grupo tratado localmente com a associação de tratamentos, porém em ratos sistemicamente saudáveis (GARCIA *et al.*, 2016).

As limitações do presente estudo baseiam-se na simulação da imunossupressão utilizando o quimioterápico 5-Fluorouracil em 2 aplicações, em dosagem baseada em outro estudo experimental (THEODORO *et al.*, 2017) e no protocolo de uso local do probiótico. Apenas um estudo publicado na literatura utilizou o protocolo de tratamento com o mesmo probiótico utilizado nesse estudo (GARCIA *et al.*, 2016). Portanto, o protocolo de tratamento local com PRO *Saccharomyces Cerevisiae* como monoterapia ou como coadjuvante à RAR ainda não está bem estabelecido. Sendo assim, outros estudos precisam ser realizados para avaliar o efeito de outros protocolos no tratamento da PE em ratos imunossuprimidos.

6 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo com a metodologia utilizada, pode-se concluir que o uso do quimioterápico 5FU agravou a PE, que se caracterizou por infiltrado inflamatório intenso e severa destruição óssea ao longo do tempo. Além disto o uso local do probiótico, associado à terapia mecânica de RAR, minimizou os efeitos do quimioterápico nos tecidos periodontais reduzindo o processo inflamatório e a severidade da destruição periodontal em animais imunossuprimidos.

REFERÊNCIAS

- ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 33, p. 8-13, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.014>.
- ANDERSEN, R.; LOEBE, N.; HAMMND, D. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **J. Clin. Dent.**, v. 18, p. 34-38, 2007.
- AOKI, A. *et al.* Lasers in nonsurgical periodontal therapy. **Periodontol.** 2000, v. 36, p. 59–97, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2004.03679.x>.
- ARIAS, J. L. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2340-2369, 2008. <https://doi.org/10.3390/molecules13102340>.
- AYKOL, G. *et al.* The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 82, n. 3, p. 481-488, 2011. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100195>.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- DELLA RICCIA, D. N. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. **Oral Dis.**, v. 13, n. 4, p. 376-85, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x>.
- EKE, P. I. *et al.* Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 - 2012. **J. Periodontol.**, v. 86, n. 5, p. 611-622, 2015. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140520>.
- FOUREAUX, R. C. *et al.* Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. **J Periodontol.**, v. 85, n. 7, p. 975-983, 2014. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130356>.

FRANCO, E. J. *et al.* Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, v. 11, n. 1, p. 41-47, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.10.002>.

GARCIA, V. G. *et al.* Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, n. 12, p. 1106-1114, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01785.x>.

GARCIA, V. G. *et al.* Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 143-150, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1099-y>.

GARCIA, V. G. *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.**, v. 49, n. 5, p. 584-594, 2014. <https://doi.org/10.1111/jre.12138>.

Garcia, V. G. *et al.* Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support. Care Cancer**. v. 23, n. 7, p. 2007–2017. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2563-y>

GARCIA, V. G. *et al.* Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support. Care Cancer**, v. 23, n. 7, p. 2007–2017, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2563-y>.

GARCIA, V. G. *et al.* Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontal. Res.**, v. 51, n. 1, p. 26–37, 2016. <https://doi.org/10.1111/jre.12274>.

GOKHALE, S. R. *et al.* A comparative evaluation of the efficacy of diode laser as an adjunct to mechanical debridement versus conventional mechanical debridement in periodontal flap surgery: a clinical and microbiological study. **Photomed. Laser. Surg.**, v. 30, n. 10, p. 598-603, 2012. <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3252>.

GRAVES, D. T. *et al.* The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 2, p. 89-105, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01172.x>.

GUSMAN, D. *et al.* Antineoplastic agents exacerbate periodontal inflammation and aggravate experimental periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 46, n. 4, p. 457–469, 2019. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13101>.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

HILLMAN, J. D.; SHIVERS, M. Interaction between wild-type, mutant and revertant forms of the bacterium *Streptococcus sanguis* and the bacterium *Actinobacillus actinomycetencomitans* in vitro and in the gnotobiotic rat. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, n. 6, p. 395-401, 1988. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(88\)90196-3](https://doi.org/10.1016/0003-9969(88)90196-3).

ISHIKAWA, H. *et al.* Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of *Lactobacillus salivarius* T12711. **J. Jap. Assoc. Periodontol.**, v. 45, n. 1, p. 105-112, 2003.

ISHIKAWA, I. *et al.* Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? **Periodontol.** 2000, v. 50, p. 90-126, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2008.00283.x>.

IVANAGA, C. A. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin and LED, as an enhancement to scaling and root planing in the treatment of residual pockets in diabetic patients: A randomized and controlled split-mouth clinical trial. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 27, p. 388–395, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.005>.

KILKENNY, C. *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. **Br. J. Pharmacol.**, v. 160, n. 7, p. 1577–1579, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.**, v. 62, n.1, p. 59-73, 1991. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.1.59>.

KRASSE, P. *et al.* Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. **Swed. Dent. J.**, v. 30, n. 2, p. 55-60, 2006.

LALLA, R. V.; SAUNDERS, D. P.; PETERSON, D. E. Chemotherapy or radiation-induced oral mucositis. **Dent. Clin. North Am.**, v. 58, n. 2, p. 341–349, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.12.005>.

LIAW, A.; MILLER, C.; NIMMO, A. Comparing the periodontal tissue response to non-surgical scaling and root planing alone, adjunctive azithromycin, or adjunctive amoxicillin plus metronidazole in generalized chronic moderate-to-severe periodontitis: a preliminary randomized controlled trial. **Aust. Dent. J.**, v. 64, n. 2, p. 145–152, 2019. <https://doi.org/10.1111/adj.12674>.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n.5, p. 330–338, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>.

LONGO, M. *et al.* Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: histomorphometrical, immunohistochemical, immunological and microbiological analyses. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 25, p. 92–102, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.014>.

LU, H. *et al.* Chronic stress enhances progression of periodontitis via alfa1-adrenegic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. **Exp. Mol. Med.**, v. 46, n. 10, p. e118, 2014. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.65>.

MATSUOKA, T. *et al.* Effect of oral Lactobacillus salivarius TI 2711 (LSI) administration of periodontopathic bacteria in subgingival plaque. **J. Jpn. Soc. Periodontol.**, v. 48, p. 315–324, 2006.

MAYANAGI, G. *et al.* Probiotic effects of orally administered Lactobacillus salivarius WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 6, p. 506–513, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01392.x>.

MESSORA, M. R. *et al.* Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 12, p. 1818–1826, 2013. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.120644>.

MEURMAN, J. H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? **Eur. J. Oral Sci.**, v. 113, n. 3, p. 188-196, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00191.x>.

MIESSI, D. Lactobacillus reuteri associated with scaling and root planing in the treatment of periodontitis in rats submitted to chemotherapy. **Arch. Oral Biol.**, v. 117, n. 104825, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104825>

MOLON, R. S. *et al.* Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **J. Periodontol.**, v. 85, n. 3, p. 465-477, 2014. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130225>.

MORALES, A. *et al.* Clinical effects of probiotic or azithromycin as an adjunct to scaling and root planning in the treatment of stage III periodontitis: a pilot randomized controlled clinical trial. **BMC Oral Health**, v. 21, p.12, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01276-3>.

NACKAERTZ, O. *et al.* Replacement therapy for periodontitis: pilot radiographic evaluation in a dog model. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 12, p. 1048-1052, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01333.x>.

NAIDU, M. U. *et al.* Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. **Neoplasia**, v. 6, n. 5, p. 423-431, 2004. <https://doi.org/10.1593/neo.04169>.

NASSAR, P. O. *et al.* Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 44, n. 4, p. 479-488, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01143.x>.

NOORDHUIS, P. *et al.* 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Ann. Oncol.**, v. 15 n. 7, p. 1025-1032, 2004. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh264>.

NUERNBERG, M. *et al.* Effects of butyl toluidine blue photosensitizer on antimicrobial photodynamic therapy for experimental periodontitis treatment in rats. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 31, p. 101868, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101868>.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **J. Biomed. Biotech**, v. 2011, p. 754857, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/754857>.

PAPAPANOU, P. N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J. Periodontol.**, v. 89, Suppl 1, p. S173–S182, 2018. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>.

PÖLLÄNEN, M. T.; SALONEN, J. I.; UITTO, V. J. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. **Periodontol.** 2000, v. 31, p. 12-31, 2003. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03102.x>.

PREEJA, C. *et al.* Unveling the role of stress in periodontal etiopathogenesis: an evidence-based review. **J. Investig. Clin. Dent.**, v. 4, n. 2, p. 78-83, 2013. <https://doi.org/10.1111/jicd.12000>.

RAGHU NADHANAN, R. *et al.* Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 302, n. 11 p. 1440-1449, 2012. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00587.2011>.

SHIMAUCHI, H. *et al.* Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 10, p. 897-905, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x>.

SMILEY, C. J. *et al.* Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 146, n. 7, p. 525–535, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2015.01.026>.

SONIS, S. T. Oral mucositis in cancer therapy. **J. Support. Oncol.**, v. 2, n. 6, Suppl 3, p. 3–8, 2004.

STAAB, B. *et al.* The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 10, p. 850-856, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01459.x>.

- STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics and periodontal disease. **Periodontol.** **2000**, v. 51, p. 141-151, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00305.x>.
- SUGANO, N. *et al.* Effects of probiotics on periodontal disease. **Dent. Jap.**, v. 43, p. 123-126, 2007.
- TEUGHEL, W. *et al.* Guiding periodontal pockets recolonization: a proof of concept. **J. Dent. Res.**, v. 86, n.11, p. 1078-1082, 2007. <https://doi.org/10.1177/154405910708601111>.
- THEODORO, L. H. *et al.* Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment: a 6-month follow-up. **Lasers Med. Sci.**, v. 27, n. 4, p. 687-693, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0942-x>.
- THEODORO, L. H. *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, n. 5, p. 669–680, 2016. <https://doi.org/10.1111/jre.12347>.
- THEODORO, L. H. *et al.* Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. **Support. Care Cancer**, v. 25, n. 10, p. 3261–3271, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00520-017-3738-0>.
- THEODORO, L. H. *et al.* Treatment of periodontitis in smokers with multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy or systemic antibiotics: a randomized clinical trial. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 22, p. 217–222, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.04.003>.
- TSUBURA, S. *et al.* The effect of Bacillus subtilis mouth rinsing in patients with periodontitis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, n. 11, p. 1353-1356, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0790-9>.
- TSUKAMOTO, Y. *et al.* Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. **J. Periodontal Res.**, v. 47, n. 6, p. 750-757, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01490.x>.

TWETMAN, S. *et al.* Short-term effect of chewing gums containing probiotics *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. **Acta Odontol. Scand.**, v. 67, n. 1, p. 19-24, 2009. <https://doi.org/10.1080/00016350802516170>.

VICARIO, M. *et al.* Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: A preliminary randomized clinical trial. **Acta Odontol. Scand.**, v. 71, n. 3-4, p. 813-819, 2013. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.734404>.

VIVEKANANDA, M. R.; VANDANA, K. L.; BHAT, K. G. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. **J. Oral Microbiol.**, v. 2, p. 1-9, 2010. <https://doi.org/10.3402/jom.v2i0.5344>

VON BÜLTZINGSLÖWEN, I. *et al.* 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. **Oral Oncol.**, v. 37, n. 6, p. 537-544, 2001. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(01\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(01)00009-4).

WILD, C. P. *et al.* **World Cancer Report: cancer research for cancer prevention.** Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020.

WISNIEWSKA-JAROSINSKA, M. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, n. 6, p. 3679-3688, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0482-7>.

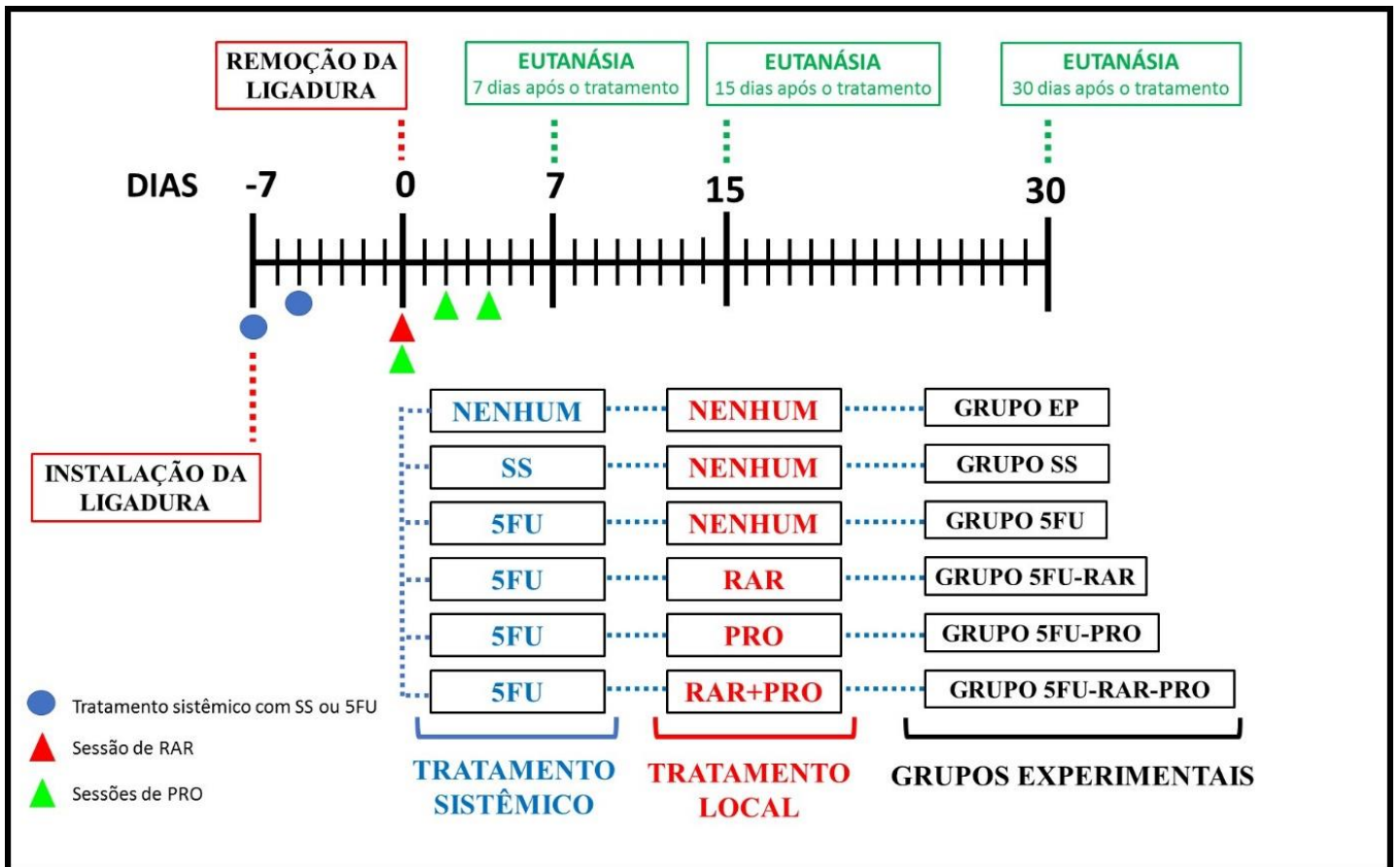
XIAN, C. J. *et al.* Damage and recovery of the bone growth mechanism in young rats following 5-fluorouracil acute chemotherapy. **J. Cell. Biochemistry**, v. 99, n. 6, p. 1688-1704, 2006. <https://doi.org/10.1002/jcb.20889>.

XIAO, Z; TRINCADO, C. A.; MURTAUGH, M. P. Beta-glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 102, n. 3, p. 315–320, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.013>

ZHANG, W. *et al.* Clinical, inflammatory and microbiological outcomes of full-month scaling with adjunctive glycine powder air-polishing: a randomized trial. **J. Clin. Periodontol.**, 2020. In press. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13400>.

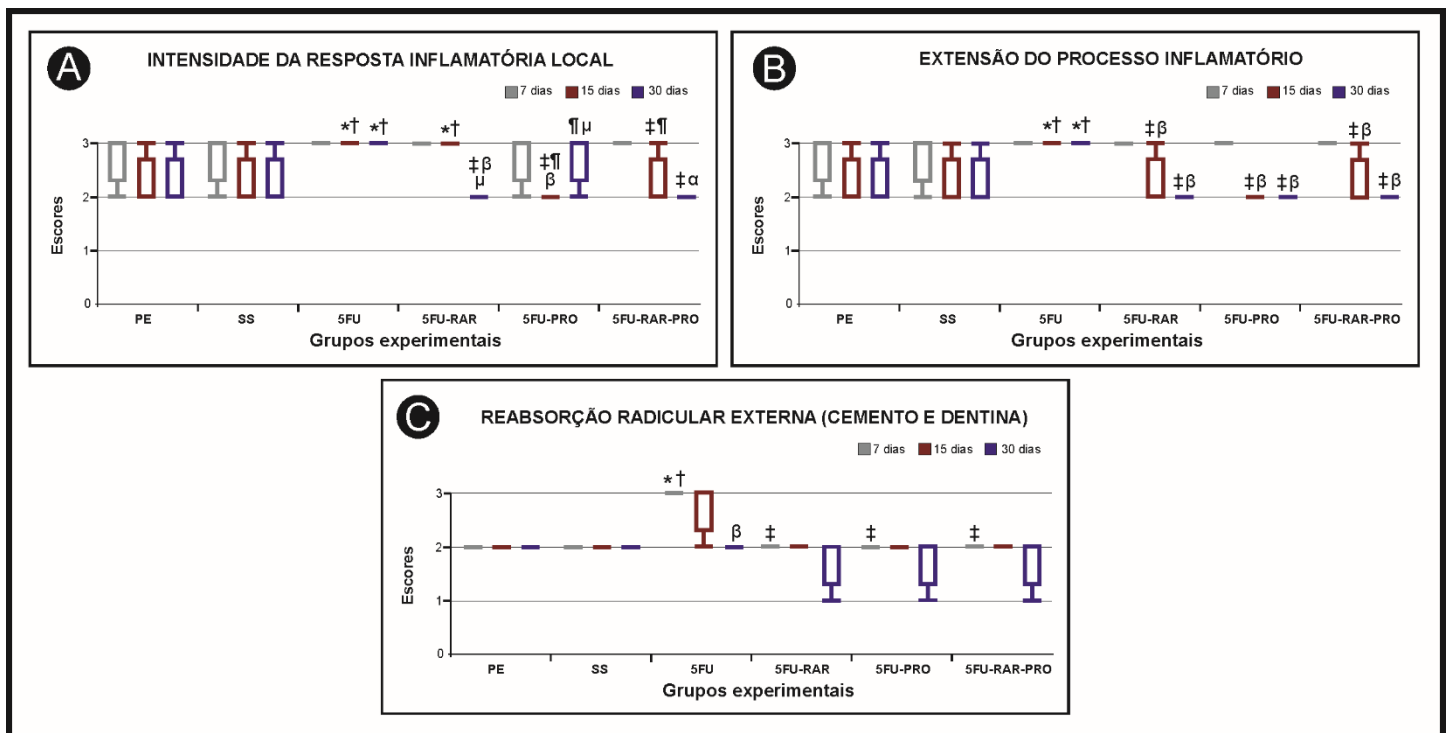
FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema ilustrando o delineamento experimental do estudo e os procedimentos experimentais realizados em seus respectivos intervalos de tempo nos diferentes grupos. Símbolos e abreviaturas: SS, solução salina; 5FU, 5-Flourouracil; RAR, Raspagem e Alisamento Radicular; PRO, probiótico; círculo azul, tratamento sistêmico com SS ou 5FU; triângulo vermelho, sessão de RAR; triângulo verde, sessões de PRO.



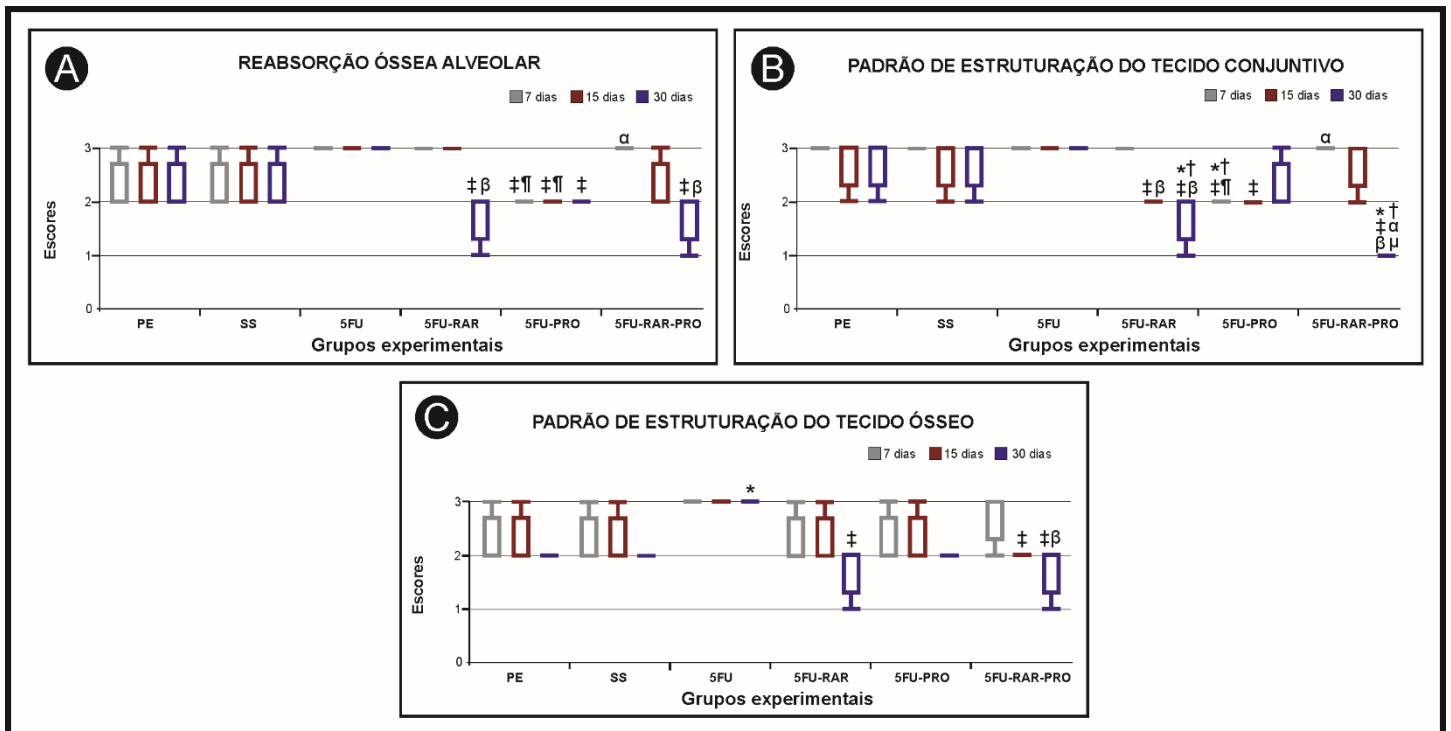
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 2 – Gráficos indicando a mediana, primeiro e terceiro quartis da intensidade da resposta inflamatória (A), extensão do processo inflamatório (B) e da reabsorção radicular externa (cimento e dentina) (C) na região de furca do primeiro molar inferior de acordo com os grupos e períodos experimentais. Símbolos: *, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo PE no mesmo período experimental; †, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo SS no mesmo período experimental; ‡, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU no mesmo período experimental; ¶, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-RAR no mesmo período experimental; α, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-PRO no mesmo período experimental; β, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 7 dias do mesmo grupo experimental; μ, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 15 dias do mesmo grupo experimental.



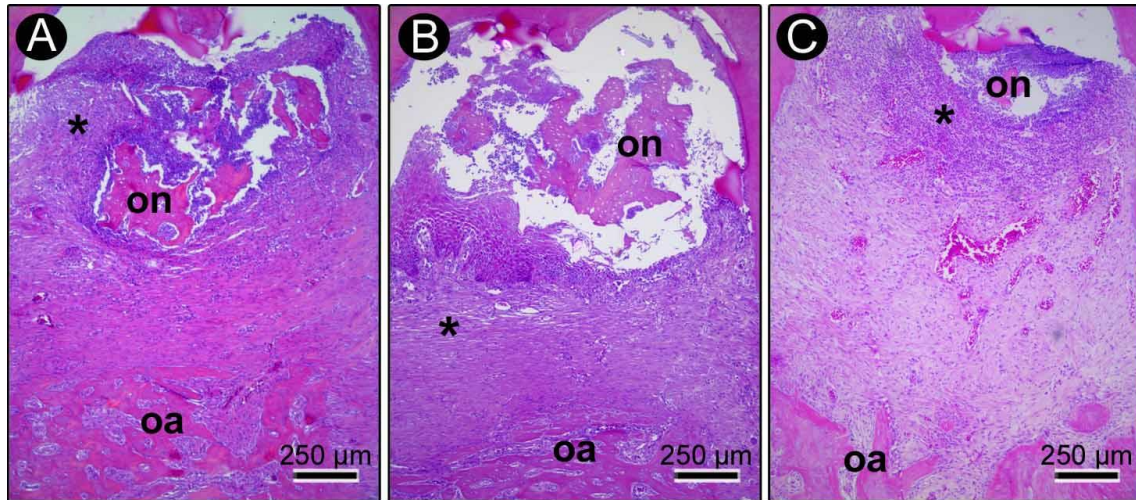
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 3 - Gráficos indicando a mediana, primeiro e terceiro quartis da reabsorção óssea alveolar (A), padrão de estruturação do tecido conjuntivo (B) e do padrão de estruturação do tecido ósseo (C) na região de furca do primeiro molar inferior de acordo com os grupos e períodos experimentais. Símbolos: *, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo PE no mesmo período experimental; †, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo SS no mesmo período experimental; ‡, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU no mesmo período experimental; ¶, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-RAR no mesmo período experimental; α, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-PRO no mesmo período experimental; β, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 7 dias do mesmo grupo experimental; μ, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 15 dias do mesmo grupo experimental.



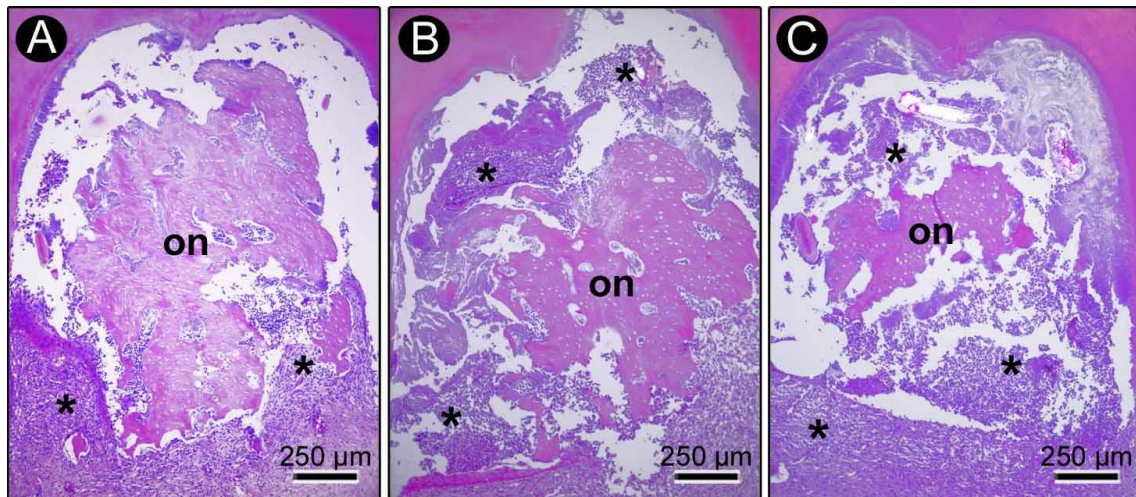
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 4 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo SS aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; on, espículas de osso necrosado; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 µm.



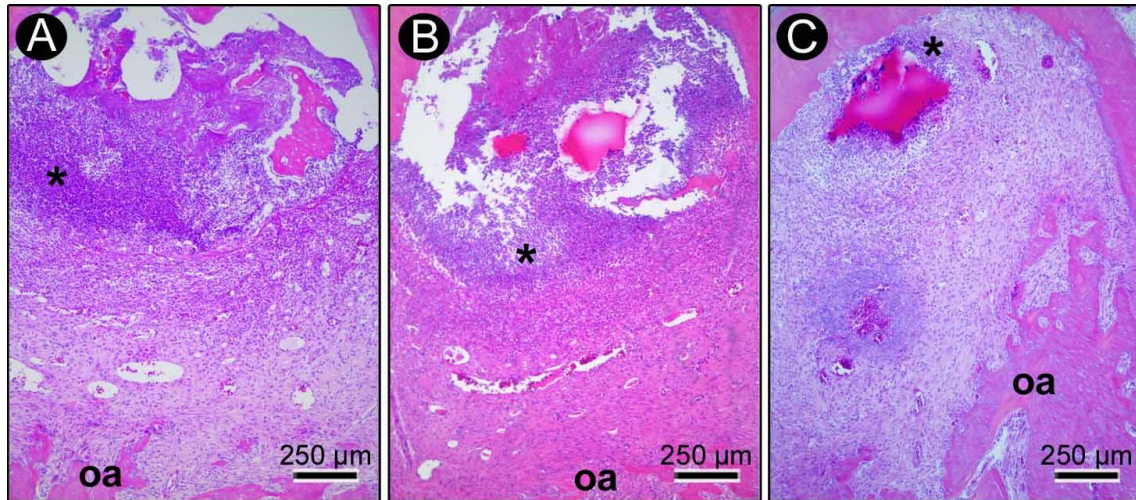
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 5 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: on, espículas de osso necrosado; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 µm.



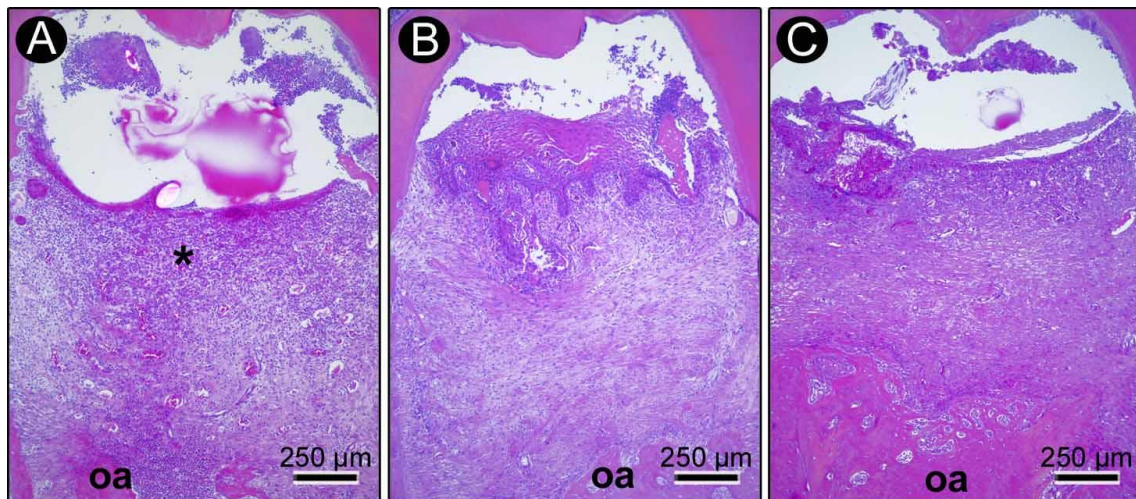
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 6 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU-RAR aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 μ m.



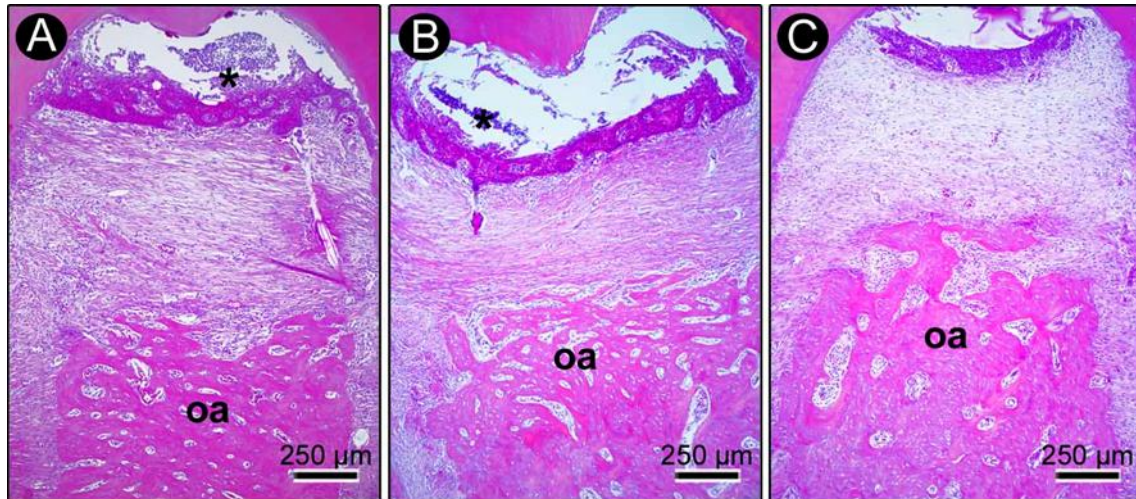
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 7 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU-PRO aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 μ m.



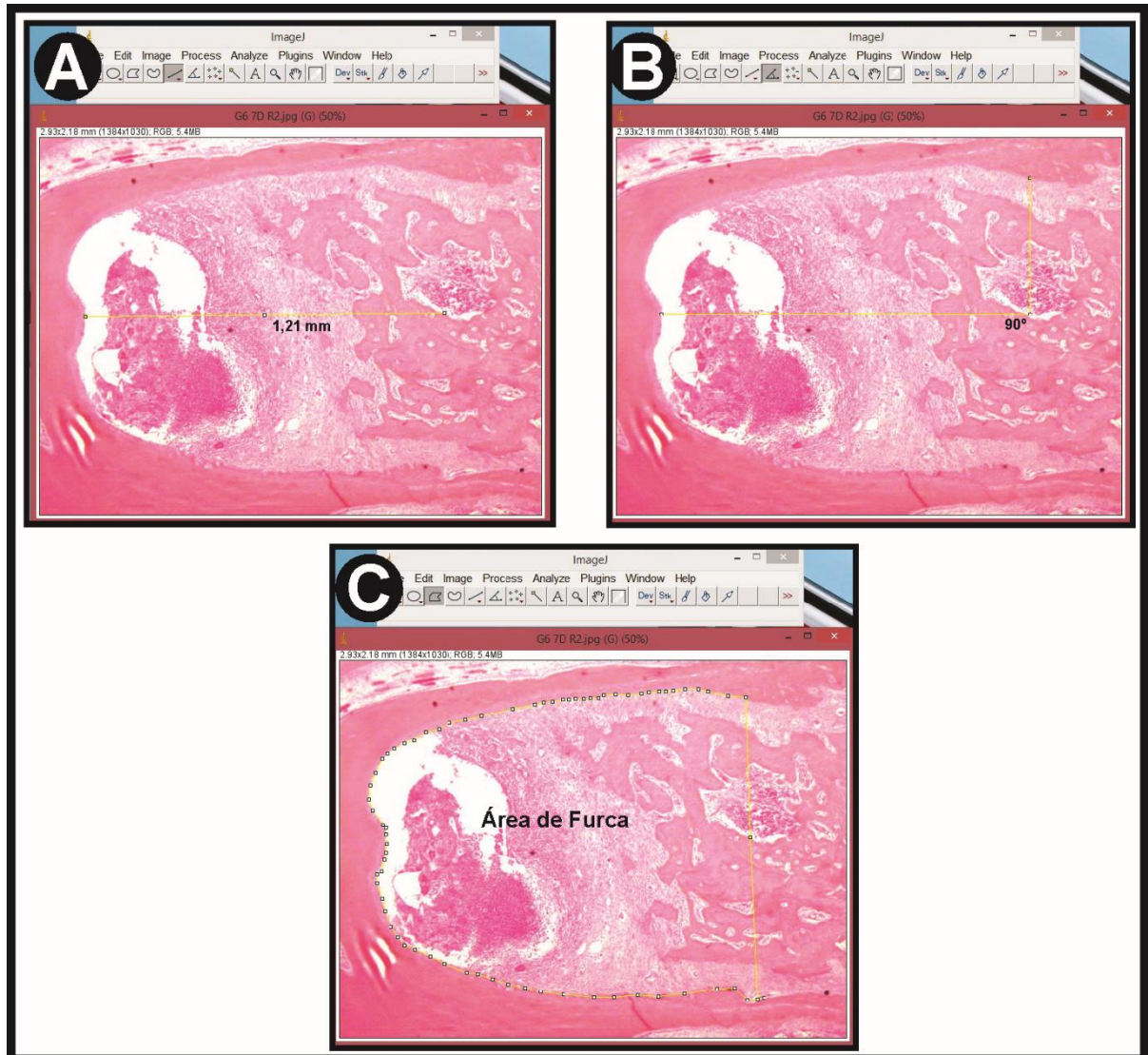
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 8 - Fotomicrografias evidenciando o nível de perda óssea alveolar e a magnitude da resposta inflamatória na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental no grupo 5FU-RAR-PRO aos 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; on, espículas de osso necrosado; *, infiltrado inflamatório. Coloração: H&E. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 µm.



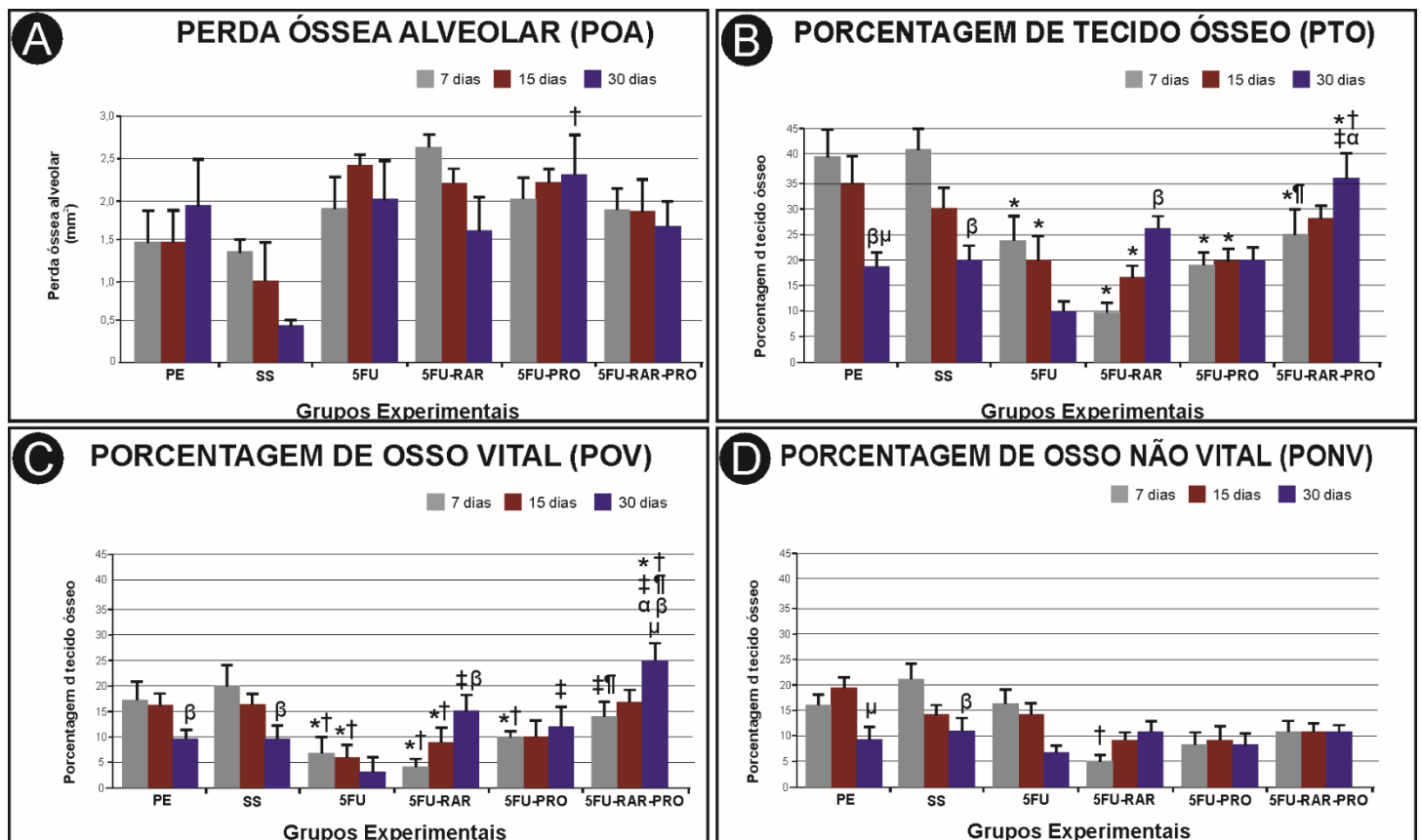
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 9 - Ilustração da forma de mensuração da área de furca (AF). Delimitação do teto da furca até 2,1mm em limite apical (A), confecção de uma reta perpendicular à linha de demarcação apical (B) e demarcação da área de furca contornando o cemento da região demarcada (C).



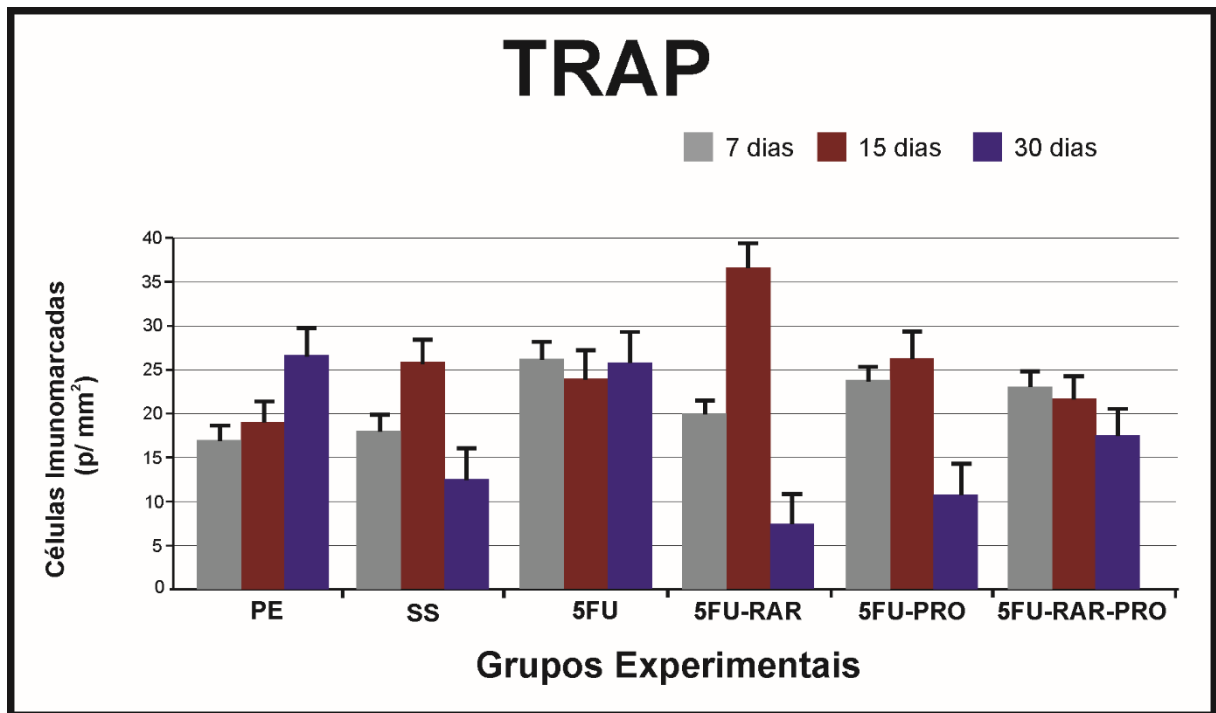
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 10 – Gráficos mostrando a média e o desvio padrão (mm^2) da perda óssea alveolar (A), porcentagem de tecido ósseo (B), porcentagem de osso vital (C) e porcentagem de osso não vital (D) na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos e períodos experimentais. Símbolos: *, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo PE no mesmo período experimental; †, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo SS no mesmo período experimental; ‡, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU no mesmo período experimental; ¶, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-RAR no mesmo período experimental; ¶, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-PRO no mesmo período experimental; α, Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo 5FU-PRO no mesmo período experimental; β, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 7 dias do mesmo grupo experimental; μ, Diferença estatisticamente significativa em comparação aos 15 dias do mesmo grupo experimental.



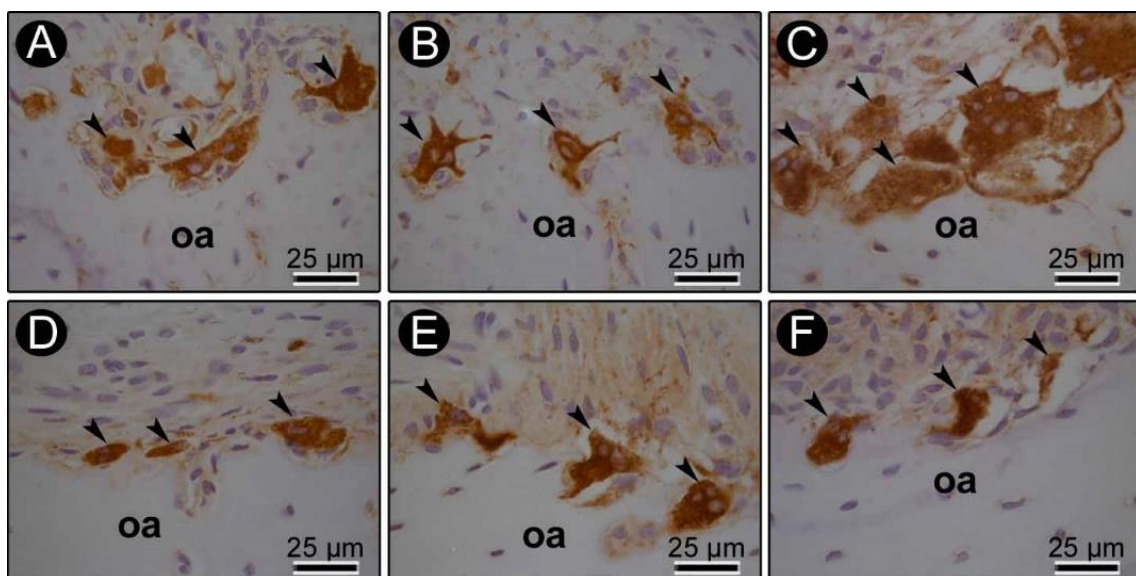
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 11 - Gráfico com distribuição das médias e desvio padrão das células TRAP-positivas na região de furca dos primeiros molares com periodontite experimental, em cada grupo e período.



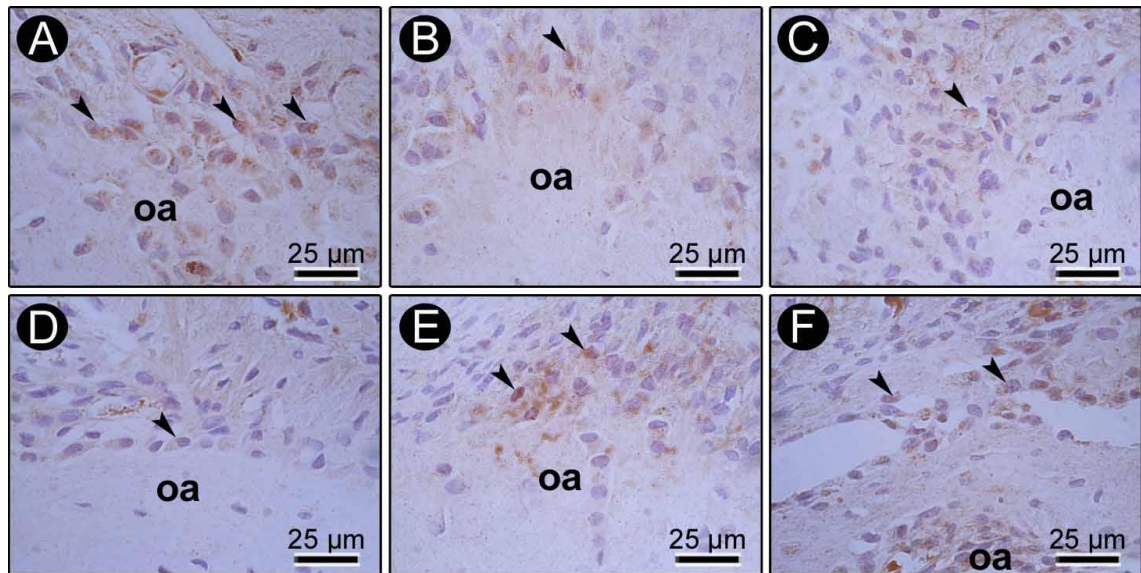
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 12 - Fotomicrografias evidenciando a imunomarcagem para TRAP na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental aos 7 dias nos grupos PE (A), SS (B), 5FU (C), 5FU-PRO (D), 5FU-RAR (E) e 5FU-RAR-PRO (F). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; setas, osteoclastos. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m



Fonte: Autor, 2021

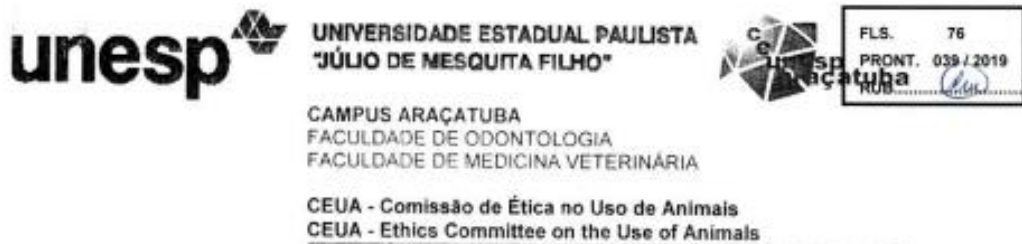
FIGURA 13 - Fotomicrografias da região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a imunomarcação para RANKL nos grupos 5FU (A), 5FU-PRO (B) e 5FU-RAR-PRO (C) aos 7 dias e, para OPG nos grupos 5FU (D), 5FU-PRO (E), e 5FU-RAR-PRO (F) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; setas, células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m.



Fonte: Autor, 2021

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

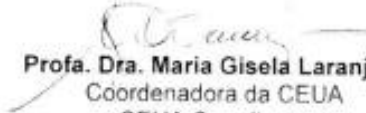


CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado **"Efeitos do uso de probiótico no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em animais imunossuprimidos com droga quimioterápica (5-FLU): estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em ratos"**, Processo FOA nº 2013-00191, sob responsabilidade de Valdir Gouveia Garcia e colaboração de Leticia Helena Theodoro e Edilson Ervolino foi aprovado pela CEUA em 17 de Fevereiro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effects of the use of probiotics in the treatment of periodontal disease in animals experimentally induced immunosupressed with chemotherapy drug (5-FLU): A histomorfometric and immunohistochemical study in rats"**, Protocol FOA nº 2013-00191, under the supervision of Valdir Gouveia Garcia and collaboration of Leticia Helena Theodoro and Edilson Ervolino had its the Final Report approved by the CEUA on February 17, 2016.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
 Coordenadora da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Benício, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B - Diretrizes para experimentação animal “ARRIVE Guidelines”

	Item	Recommendation (Kilkenny <i>et al.</i> , 2010)
TITLE	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.
ABSTRACT	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.
INTRODUCTION		
Background	3	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale. b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.
METHODS		
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.
Study design	6	For each experiment, give brief details of the study design including: a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.
Experimental procedures	7	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).
Experimental animals	8	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range). b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.
Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.

RESULTS		
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%) (Schulz <i>et al.</i> , 2010). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.
DISCUSSION		
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results (Schulz <i>et al.</i> , 2010). c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.