

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA



David Jonathan Rodrigues Gusman

***Resposta imunoinflamatória na periodontite
experimental induzida em ratos submetidos à
quimioterapia e a dose oncológica de
zoledronato***

ARAÇATUBA – SP
2020

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



David Jonathan Rodrigues Gusman

***Resposta imunoinflamatória na periodontite
experimental induzida em ratos submetidos à
quimioterapia e a dose oncológica de
zoledronato***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

ARAÇATUBA – SP
2020

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

G982r	Gusman, David Jonathan Rodrigues. Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia e a dose oncológica de zoledronato / David Jonathan Rodrigues Gusman. - Araçatuba, 2020 81f. : il. ; tab. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida Coorientador: Prof. Edilson Ervolino 1. Doenças periodontais 2. Quimioterapia 3. Modelos animais 4. Ácido zoledronico I. T. Black 6 CDD 617.63
-------	--

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

A Deus

Neste momento ofereço esta conquista a Deus, que me deu força e persistência para ultrapassar todos os obstáculos. Obrigado, pela sua grandeza, pelo seu amor incondicional, pelo cuidado com minha família, por nunca desistir de mim e por estar presente em todos momentos.

“Quanto mais acredito na ciência, mais acredito em Deus. O universo é inexplicável sem Deus”

Albert Einstein

Aos Meus Pais

À minha mãe *Maria*, ao meu pai *José*.

Ambos me proporcionaram todo suporte para a vida, contribuindo para minha a formação pessoal e profissional.

Se não fosse vocês, não conseguiria realizar mais um sonho.

Compartilho com vocês os méritos desta conquista.

Amo vocês.

Aos Meus Familiares

À minha irmã *Dejane*, meu irmão *Darcio* e sobrinhas *Amanda* e *Luiza*.

Dedico este trabalho aos meus irmãos e sobrinhas por fazerem parte da minha motivação e alegria.

Agradeço todo carinho e força que me deram em todo momento que estive fora, se não fossem vocês, seria tudo mais difícil.

Obrigado por caminharem ao meu lado!

A todos, peço desculpas por minha ausência em momentos importantes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, eu agradeço pela confiança depositada em mim e também por todas as oportunidades ao longo do meu período na pós-graduação. O senhor é um exemplo de orientador e líder. Um grande mestre, humilde, paciente, sempre disposto a ensinar e ajudar. Eu sempre levarei comigo suas orientações profissionais e pessoais. Não há palavras para expressar minha gratidão por tudo o que o senhor fez por mim durante este período em Araçatuba. Minha sincera gratidão ao senhor, pessoa na qual, me espelho muito. Espero continuar trabalhando com o senhor durante minha caminhada acadêmica. Muito obrigado de coração!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Edilson Ervolino, em todos os momentos em que precisei o senhor se mostrou uma pessoa generosa, atenciosa e foi de grande importância durante esta caminhada. O senhor é um exemplo a ser seguido de dedicação, humildade, generosidade e pela forma como exerce a docência com paixão. Obrigado por ter estado sempre presente sendo uma base importante para os trabalhos realizados.

À Prof^{ra}. Dr^a Maria José Hitomi Nagata, a senhora se mostrou alguém muito especial, sempre com serenidade, calma, e compreensão. Todos momentos que precisei, pude contar com a senhora, e mesmo em situações delicadas pessoais, a senhora estava ali, presente, me ajudando e sou grato por isso. Levarei todos os ensinamentos de vida profissional e pessoal em meu coração e passarei para meus alunos tudo o que aprendi com a senhora. Seus ensinamentos se perpetuarão para sempre. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco, foi um prazer conhecer este grande mestre, uma pessoa fantástica que nos ensina com maestria e de forma humilde. Agradeço por compartilhar conosco seus ensinamentos nas clínicas de periodontia.

“Um professor afeta a eternidade; é impossível dizer até onde vai sua influência.”

(Henry Adams)

Ao meu amigo Henrique Rinaldi Matheus, Golden boy! Garoto talentoso, brilhante, sempre disposto e prestativo. Você é um garoto muito especial, que traz orgulho para todos com que convive. Não há palavras para agradecer toda sua amizade. Agradeço, também, por me ajudar em todos os projetos e pesquisas, e por se um amigo em todos os momentos. Estarei sempre aqui para o que precisar.

Ao amigo Breno Edson Sendão Alves, agradeço pela amizade e parceria durante todo os momentos do doutorado. Você é um irmão que me acolheu e sempre que precisei esteve presente. Tudo que precisar pode contar comigo.

Ao meu grande amigo João Martins de Mello Neto, agradeço por sua amizade e fica aqui minha admiração pela pessoa que você é, um grande amigo, parceiro e irmão. Espero que tudo esteja dando mais do que certo para você na Austrália. Você é merecedor das melhores coisas deste mundo. Obrigado por tudo irmão.

À amiga Nathália Januário de Araujo, obrigado por todo carinho e generosidade comigo. Uma menina alegre, sempre me ajudou em todos os momentos que precisei. Obrigado por sua disponibilidade e companheirismo. Você é uma pessoa fantástica e uma amiga para todas as horas.

À amiga Paula Lazilha Faleiros, agradeço por me ajudar sempre que precisei. Ensinou-me muitas coisas e me ajudou muito desde o início. Você é uma pessoa dedicada, talentosa, gentil, além disso, uma grande amiga.

À amiga Vivian Cristina Noronha Novaes, sou muito grato por ter me ensinado muitas coisas e por continuar me ajudando e ensinando. Você é uma pessoa que admiro muito.

Aos amigos Luiz Guilherme Fiorin, Elisa Mara de Abreu Furquim, Bianca Rafaeli Piovezan, agradeço pela amizade e pelo companherismo em todos os momentos de experimentos na FOA. Sem vocês tudo seria muito mais difícil. Obrigado por tudo.

Aos queridos amigos da pós-graduação, Natalia Campos, Bianca, e Ana Carolina, agradeço pelo carinho e por todas as amizades nos momentos desta jornada!

A todos os professores do mestrado,

Vocês foram importantes e contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada durante estes anos.

A todos os colegas do mestrado,

Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade criada nesse período.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do ex-Diretor **Prof. Wilson Roberto Poi** e do senhor ex-Vice-Diretor **Prof. João Eduardo Gomes Filho**, e do atual senhor Diretor **Prof. Glauco Issamu Miyahara** e atual Vice-Diretor **Alberto Carlos Botazzo Delbem** por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de pós-graduação e crescimento profissional.

A ex-coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa da **Prof.^a Maria José Hitomi Nagata**, e a atual coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do **Prof. André Luiz Fraga Briso**.

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

Aos Funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – **Renato, Marco e Paulo** obrigado pela ajuda e disposição.

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

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos**,

Lilian Sayuri Mada pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

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

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

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

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

Aos pacientes, que nos depositando confiança, deram-nos a oportunidade de aprender.

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

OBRIGADO!

“Aproveite seu tempo, não viva com tanta pressa, problemas virão e eles irão embora e não se esqueça que há alguém lá em cima (Deus). E seja um homem simples, uma pessoa que você ame e entenda.”

(Lynyrd Skyrnyd – Simple man)

Gusman DJR. Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia e a dose oncológica de zoledronato [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2020.

RESUMO

O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da quimioterapia com Cisplatina (CIS) combinado ao uso de Zoledronato (ZOL) sobre os tecidos periodontais saudáveis e na progressão da periodontite experimental induzida em ratos. Foram utilizados 160 ratos machos, distribuídos em dois grupos sem periodontite experimental induzida (SPE) e com periodontite experimental induzida (PE) e subdivididos em quatro subgrupos: SS/SS: receberam duas injeções de 0,5 mL de solução salina a 0.9% (SS) (n= 20); SS/ZOL: receberam uma injeção 0,5 mL de SS e uma injeção de 100 µg/kg de ZOL diluído 0,45 mL em SS (n= 20); CIS/SS: receberam uma injeção de CIS (5mg/kg) e outra injeção de 0,5 mL de SS (n= 20); CIS/ZOL: receberam uma injeção de CIS (5mg/kg) e uma injeção de 100 µg/kg de ZOL diluído 0,45 ml em SS (n= 20). A administração ocorreu por via intraperitoneal em um intervalo de três dias, durante oito semanas. Na quarta semana, foi realizado a indução da PE no primeiro molar inferior esquerdo. Nos períodos de 14 e 28 dias após indução da PE, os animais foram eutanasiados pela administração de dose letal de thiopental (150mg/kg). As mandíbulas obtidas foram fixadas em formaldeído tamponado 4%, descalcificadas em EDTA e incluídas em parafina para confecção de cortes histológicos seriados de 4 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina e realização de reações imunoistoquímicas. Foi realizado análise histológica (escores), histométrica de porcentagem de osso na furca (POF), porcentagem de osso necrosado (PON) e padrões de imunomarcacão para TNF α , IL-1 β e TRAP. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (p<0,05) em programa computacional especializado. Foi observado diminuicão do espaço do ligamento periodontal (aos 28 dias) e maior PON (aos 14 e 28 dias) em SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL comparado a SPE-SS/SS e SPE-CIS/SS. Houve menor perda óssea e maior PON em PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL comparado a PE-SS/SS e PE-CIS/SS aos 14 e 28 dias. Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o uso combinado de CIS e ZOL é potencial fator de risco para desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares, tanto em periodonto saudável quanto em periodonto acometido pela PE.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Quimioterapia. Modelos animais. Ácido zoledrónico.

Gusman DJR. Immunoinflammatory response of the experimental periodontitis induced in rats subjected to chemotherapy and anticancer dose of zoledronic acid. [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2020.

ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate the effects of Cisplatin (CIS) chemotherapy combined with zoledronic acid (ZOL) on healthy periodontal tissues and on the progression of experimental periodontitis induced in rats. Were used 160 male rats, divided into two groups, either without induction of experimental periodontitis (NEP) or with induction of experimental periodontitis (EP), and subdivided into 4 subgroups: SS/SS: received two injections of 0.5 mL of saline solution 0.9% (SS) (n=20); SS/ZOL: received one injection of SS and one injection of 100 µg/kg of ZOL solved in 0.45 mL of SS (n=20); CIS/SS: received one injection of CIS (5mg/kg) and one injection of 0.5 mL of SS (n=20); CIS/ZOL: received one injection of CIS (5mg/kg) and one injection of 100 µg/kg of ZOL solved in 0.45 mL of SS (n=20). The drugs/SS were administered via intraperitoneal at 3 days interval, during 8 weeks. On the fourth week, EP was induced in the left mandibular first molar. At 14 and 28 days after EP induction, the animals were euthanized by lethal dose of sodium thiopental (150mg/kg). The collected mandibles were fixed in buffered 4% formaldehyde solution, demineralized in EDTA and embedded in paraffin for obtention of 4 µm thick semi-serial sections. Then, were submitted to Hematoxylin and Eosin staining and immunohistochemistry. Was performed the following analysis: histologic (scores), histometric of the percentage of bone in the furcation (PBF) and percentage of necrotic bone (PNB), and immunolabelling pattern for TNF α , IL-1 β and TRAP. The collected data were submitted to statistical analysis (p<0,05) using an appropriate computer software. Was observed reduction in the periodontal ligament space (at 28 days) and increased PNB (at 14 and 28 days) in NEP-SS/ZOL and NEP-CIS/ZOL when compared with NEP-SS/SS and NEP-CIS/SS. Less bone loss and higher PBF was observed in EP-SS/ZOL and EP-CIS/ZOL when compared with EP-SS/SS and EP-CIS/SS at 14 and 28 days. Within the limits of the present research, it can be concluded that combined use of CIS and ZOL is a potential risk factor for the development of medication related osteonecrosis of the jaw both in healthy periodontium and periodontium affected by EP.

Key words: periodontal disease (s). Chemotherapy. Animal models. Zoledronic acid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo em ratos sem indução da periodontite experimental nos diferentes grupos e períodos experimentais.	55
Tabela 2	Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo em ratos com periodontite experimental induzida nos diferentes grupos e períodos experimentais.	56
Tabela 3	Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) dos dados histométricos da porcentagem de osso na furca na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.	57
Tabela 4	Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) da porcentagem de osso necrosado (PON) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.	58
Tabela 5	Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) das células TRAP-positivas na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotomicrografias evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de ratos sem periodontite experimental nos períodos de 14 e 28 dias (A-P). SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL apresentaram diminuição do espaço do ligamento periodontal aos 28 dias (J, L, N e P). $SPE-SS/SS < SPE-CIS/SS < SPE-SS/ZOL < SPE-CIS/ZOL$ em relação a diferença de PON (osteócitos) entre os grupos. (A-P). Abreviações: CIS: Cisplatina; D: dias; μm : micrometros; PE: periodontite experimental; SPE: sem periodontite experimental; SS: solução salina; ZOL: zoledronato. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 μm . 60
- Figura 2** Fotomicrografias evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de ratos com periodontite experimental nos períodos de 14 e 28 dias (A-P). Pequena perda óssea em PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL (B, F, J, N, D, H, L e P). $PE-SS/SS < PE-CIS/SS < PE-SS/ZOL < PE-CIS/ZOL$ em relação a diferença de PON (osteócitos) entre os grupos. Abreviações: CIS: Cisplatina; D: dias; μm : micrometros; SPE: sem periodontite experimental; SS: solução salina; ZOL: zoledronato. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 μm . 61
- Figura 3** Fotomicrografias evidenciando a quantidade de células TRAP-positivas (A-D) e o padrão de imunomarcção para TNF- α (E-H), IL-1 β (I-K) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental (PE) induzida nos períodos de 14 dias (TRAP) e 28 dias (TNF- α e IL-1 β). Abreviações: CIS: Cisplatina; D: dias; μm : micrometros; oa: osso alveolar; PE: periodontite experimental; SPE: sem periodontite experimental; SS: solução salina; ZOL: zoledronato. Setas: células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras de escala 100 μm . 62
- Figura 4** Gráficos mostrando a mediana e o desvio interquartilho para os escores de IL-1 β (A, C) e TNF- α (A, C) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período nos animais sem doença periodontal induzida (A, B) e com doença periodontal induzida (C e D). Símbolos: *diferença estatisticamente significativa com SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias; [†] diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS aos 28 dias. . Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$) em todos os testes. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

≅ Aproximadamente

5-FU – 5 Fluorouracil

AF - Área total da furca

ANOVA – Análise de Variância

AO - Área ocupada por tecido ósseo

ARRIVE - Animal Research: Reporting in Vivo Experiments

BP - Bisfosfonatos

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIS – Cisplatina

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DP - Doença Periodontal

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g – Grama

H&E – Hematoxilina e eosina

IR – células imunoreativas

IL-1 β – Interleucina 1 β

μ m – Micrometros

mg – Miligramas

μ g/kg – Microgramas por quilo

mg/Kg - Miligramas por quilo

mL - Mililitros

mm² – Milímetros quadrado

ONMB – Osteonecrose dos maxilares relacionada aos bisfosfonatos

ON – Tecido ósseo necrosado

PE – Periodontite experimental

PON – Porcentagem de osso necrosado

POF - Porcentagem de Osso na Furca

RANKL - ativador de receptores do fator nuclear kappa- β ligante

SPE – Sem Periodontite Experimental

SS – Solução Salina 0,9%

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRAP - Tartrate-resistant acid phosphatase

UNESP – Universidade Estadual Paulista

ZOL - Zoledronato

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	64
Anexo B	Delineamento do estudo.	65
Anexo C	Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica da porcentagem de osso na furca.	66
Anexo D	Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica porcentagem de osso necrosado.	67
Anexo E	Normas para Publicação segundo o Periódico – Journal of Clinical Periodontology	68

Sumário

Manuscrito para publicação	21
Página de título	22
Resumo	23
Introdução	24
Materiais e Métodos	27
Resultados	33
Discussão	37
Conclusão	41
Agradecimentos	42
Referências	43
Anexos	64

*Manuscrito para
Publicação*¹

¹ Normatização Segundo a *Journal of Clinical Periodontology* (Anexo E)

Título

Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia e a dose oncológica de zoledronato

Autores:

David Jonathan Rodrigues Gusman¹, Edilson Ervolino², Juliano Milanezi de Almeida^{1*}

¹Department of Diagnosis and Surgery – Division of Periodontics, School of Dentistry, Sao Paulo State University (UNESP), Aracatuba, Sao Paulo, Brazil.

²Department of Basic Sciences, School of Dentistry, Sao Paulo State University (UNESP), Aracatuba, Sao Paulo, Brazil.

Running title: Quimioterápicos e periodontite experimental.

Relevância Clínica

Fundamentação para o estudo: O impacto da CIS e do ZOL sobre o periodonto ainda não está totalmente elucidado. Um modelo animal pode auxiliar a avaliar o efeito da CIS e do ZOL sobre os tecidos periodontais saudáveis e durante a progressão da PE induzida em ratos.

Principais conclusões: A combinação de CIS/ZOL demonstrou aumentar a quantidade de tecido ósseo não vital em animais saudáveis ou em animais com PE induzida. **Implicações práticas:** O uso combinado de CIS e ZOL é potencial fator de risco para desenvolvimento da ONMB tanto em um periodonto saudável como na periodontite. O controle de placa bacteriana em pacientes submetidos à combinação destes medicamentos se torna ainda mais importante após esses achados.

***Corresponding author:**

Juliano Milanezi de Almeida

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836362897

E-mail: jumilanezi@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da quimioterapia com Cisplatina (CIS) combinado ao uso de Zoledronato (ZOL) sobre os tecidos periodontais saudáveis e na progressão da periodontite experimental induzida em ratos.

Materiais e métodos: Foram utilizados 160 ratos machos, distribuídos em 2 grupos sem periodontite experimental induzida (SPE) e com periodontite experimental induzida (PE) e subdivididos em 4 subgrupos: SS/SS: receberam duas injeções de 0,5 mL de solução salina a 0.9% (SS) (n= 20); SS/ZOL: receberam uma injeção 0,5 mL de SS e uma injeção de 100 µg/kg de ZOL diluído 0,45 mL em SS (n= 20); CIS/SS: receberam uma injeção de CIS (5mg/kg) e outra injeção de 0,5 mL de SS (n= 20); CIS/ZOL: receberam uma injeção de CIS (5mg/kg) e uma injeção de 100 µg/kg de ZOL diluído 0,45 mL em SS (n= 20). A administração ocorreu por via intraperitoneal em um intervalo de três dias, durante oito semanas. Na quarta semana, foi realizado a indução da PE no primeiro molar inferior esquerdo. Nos períodos de 14 e 28 dias após indução da PE, os animais foram eutanasiados. As mandíbulas foram processadas para coloração com Hematoxilina e Eosina e realização de reações imunoistoquímicas. Foi realizado análise histológica, histométrica de porcentagem de osso na furca (POF), porcentagem de osso necrosado (PON) e padrões de imunomarcção para TNF α , IL-1 β e TRAP. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (p<0,05).

Resultados: Foi observado diminuição do espaço do ligamento periodontal (aos 28 dias) e maior PON (aos 14 e 28 dias) em SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL comparado a SPE-SS/SS e SPE-CIS/SS. Houve menor perda óssea e maior PON em PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL comparado a PE-SS/SS e PE-CIS/SS aos 14 e 28 dias.

Conclusão: Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o uso combinado de CIS e ZOL é potencial fator de risco para desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares, tanto em periodonto saudável quanto em periodonto acometido pela PE.

Palavras chaves: doenças periodontais; quimioterapia; modelos animais, ácido zoledronico

1 INTRODUÇÃO

Os tecidos periodontais saudáveis, e em especial, quando acometidos pela doença periodontal (DP) podem ser afetados por uma variedade de drogas, principalmente, aquelas que interagem com a resposta imune e inflamatória (Alani & Seymour, 2014). Medicamentos como antidepressivos, benzodiazepínicos, imunossupressores, anticonvulsivantes, contraceptivos orais e anti-hipertensivos podem causar modificações sistêmicas que influenciem na progressão da DP (Aguiar et al., 2013; Araújo et al., 2013; Gomes et al., 2013; Kim et al., 2013; Nakib & Ashrafi, 2011; Nassar et al., 2009; Preshaw, 2013; Seymour, 2006; Spolidorio et al., 2007). Além disto, os antineoplásicos também têm sido estudados como medicamentos que podem influenciar a progressão da DP (Garcia et al., 2015; Gusman, 2017; Theodoro et al., 2016; Gusman et al., 2019).

Esses medicamentos produzem efeitos tóxicos na cavidade bucal pela característica de rápida divisão celular. As drogas usadas não apresentam ação específica sobre as células cancerosas e, por não as diferenciar das células normais com alto índice mitótico são lesivas a ambas, causando apoptose (Arias, 2008; Guchelaar et al., 1998; Guggenheimer et al., 1977; McGuire, 2002; Gusman et al., 2017).

A maioria dos casos de quimioterapia para o tratamento do câncer se baseia na administração de uma dose máxima tolerável pelo paciente, promovendo a erradicação do maior número de células tumorais. O principal problema desse método é a toxicidade aguda acumulada para os tecidos normais, incluindo as células do sistema imune. Assim, a quimioterapia convencional está comumente associada com uma variedade de efeitos colaterais, como severa imunossupressão (Half & Arber, 2009; Saltz & Kemeny, 1996).

Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, a Cisplatina (CIS) se destaca por ser amplamente utilizada (Lorch et al., 2011; Surendiran et al., 2010; Taylor et al., 1994; Vermorken et al., 2014). A CIS é um composto com ampla atividade antineoplásica, utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, tais como: os de cabeça e pescoço, testículo, pulmão, mama, urotelial, ovário, glândula adrenal, carcinoma de bexiga e melanoma avançado (Choi et al., 2015; Linardou et al., 2015; Mihai, 2015; Pang et al., 2007;

Wang & Lippard, 2005; Zhang et al., 2009), cujas incidências aumentam com o passar dos anos (INCA, 2013, 2019).

A literatura reporta, durante o tratamento com os quimioterápicos sua associação com o bisfosfonato (BP) ácido zoledrônico (ZOL), pois este medicamento emergiu como uma opção terapêutica para complicações esqueléticas, alívio de dor e prevenção de metástases ósseas em neoplasias malignas osteotrópicas (mama, rim, pulmão e próstata) (Coleman, 2005; Drake, Clarke & Khosla, 2008; Hortobagyi, 2005; Okamoto et al., 2013; Winter et al., 2013; Zhao et al., 2011). O ZOL também é utilizado no tratamento de osteopatias como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo, hipercalcemia (Drake, Clarke & Khosla, 2008).

Dentre as reações adversas ocasionadas pelo uso dos BPs, destaca-se na área da odontologia, a osteonecrose dos maxilares relacionada aos bisfosfonatos (ONMB) (Russell, 2011). A ONMB é definida como presença de osso exposto na região maxilofacial por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos à tratamento prévio ou atual com droga antirreabsortiva ou anti-angiogênica, e que não possui história prévia de radioterapia nos maxilares (Ruggiero et al., 2014).

Dentre os supostos fatores etiopatológicos que atualmente são apontados como desencadeadores da ONMB estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, o que resulta no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo e consequentemente áreas de tecido ósseo não vital, o que seria capaz de favorecer o estabelecimento de necrose; o potente efeito antiangiogênico dos BPs, o que resultaria em necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzido pelos BPs, os quais aumentam sobremaneira a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto; e o efeito citotóxico dos BPs sobre as células dos tecidos que compõem a mucosa bucal, o que resulta na diminuição da capacidade de reparo dos tecidos moles (Allen & Burr, 2009; Ruggiero et al., 2014). Todavia, muitas são as hipóteses e poucas são as comprovações científicas (Allen & Burr, 2009).

Recentemente, estudos clínicos tem atentado para o fato de que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é o principal fator de risco local, ou seja, a presença prévia de inflamação e infecção local exercem um papel crucial no desencadeamento

da ONMB pós-exodontia (Kang et al., 2013; Ruggiero et al., 2014). Diante do supracitado, a compreensão exata de como a DP participa na patofisiologia da ONMB é de extrema importância, portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da quimioterapia com CIS combinado ao uso de ZOL sobre os tecidos periodontais saudáveis e na progressão da periodontite experimental induzida em ratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

No presente estudo foram utilizados 160 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 260g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente “Universidade do Oeste Paulista” - UNOESTE e posteriormente mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da FOA/UNESP, sob as condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola), onde tiveram ração (Ração GuabiNutrilabor – Mogiana Alimentos S.A) e água *ad libitum*. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015) e segundo o guia The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010.) após aprovação pela Comitê de Ética o Uso de Animais (CEUA) (Processo 00608-2017) (Anexo A), da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

2.2 Cálculo Amostral

Para determinação do tamanho amostral, dois pontos foram considerados: 1 – Estudos prévios com metodologia semelhante realizados (Almeida et al., 2007. 2008a, 2008b; Gusman et al., 2019). Foi realizado um estudo piloto e determinada a diferença mínima entre as médias obtidas de cada tratamento. Foi determinado o poder do teste de 80% com valor de *p* de 5%. Estes dados foram submetidos ao BioEstat 5.0 (BioEstat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil), que determinou um número mínimo de 8 repetições por tratamento em cada período. Considerando a possibilidade de perdas em animais modificados

sistemicamente, o número de animais em cada grupo/período experimental foi estabelecido em $n = 10$.

2.3 Grupos Experimentais

Este estudo seguiu um delineamento controlado, randomizado e cego. Os animais foram numerados sequencialmente de 1 a 160. A sequência numérica foi carregada no software Minitab® 17 (Minitab Inc., State College, PA, EUA). A randomização dos animais (taxa de alocação 1:1) foi realizada por uma tabela randomica gerada em computador por um membro externo e cego ao estudo.

Os animais foram separados em dois grupos, sem periodontite experimental induzida (**SPE**) (**n=80**) e com periodontite experimental induzida (**PE**) (**n=80**), subdivididos em 4 subgrupos (total 8 grupos) que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo SPE-SS/SS (n=20) e Grupo PE-SS/SS (n=20): Receberam duas injeções de 0,5 mL de solução salina fisiológica 0.9% (SS) a cada três dias, durante oito semanas.

Grupo SPE-CIS/SS (n=20) e Grupo PE-CIS/SS (n=20): Receberam uma injeção de CIS (5mg/kg) e outra injeção de 0,5 mL de SS a cada três dias, durante oito semanas.

Grupo SPE-SS/ZOL (n=20) e Grupo PE-SS/ZOL (n=20): Receberam uma injeção 0,5 mL de SS e uma injeção de 100 µg/kg de ZOL diluído 0,45 mL em SS a cada três dias, durante oito semanas.

Grupo SPE-CIS/ZOL (n=20) e Grupo PE-CIS/ZOL (n=20): Receberam uma injeção de CIS (5mg/kg) e uma injeção de 100 µg/kg de ZOL diluído 0,45 mL em SS a cada três dias, durante oito semanas.

O delineamento do estudo está apresentado no Anexo B.

2.4 Protocolo medicamentoso

A administração de SS (EquiPLEX Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), CIS (Fauldcispla, 10 mg/10 mL, Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) ou ZOL (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal. Para a CIS a dose foi de 5 mg/kg (Havelka et al., 2007). A dose de ZOL foi de 100 µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 mL de SS (Ervolino et al., 2019). A dose de CIS, ZOL e o plano de tratamento medicamentoso consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para terapia oncológica de humanos (Du Bois & Du Bois, 1989; Food and Drug Administration, 2005; Nakasato et al., 2012; Winter et al., 2013; Zhao et al., 2011).

2.5 Sedação e Anestesia

Inicialmente, os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrado. Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70 mg/Kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA.) e 6 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil), aplicados intramuscular no bíceps femoris da pata direita. Nos casos em que não se obteve o necessário efeito do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada (Fernandes et al., 2009).

2.6 Método de Indução da Periodontite Experimental

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada a qual permitiu a manutenção da abertura bucal facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão no 24; Coats Corrente, SP, Brasil.) ao redor dos primeiros molares inferiores, direito e esquerdo, ao nível do sulco gengival e mantidos por

meio de nós cirúrgicos de Almeida et al. (2008a, 2008b) e Gusman et al. (2019). Esta ligadura atuou como irritante gengival favorecendo o acúmulo de placa bacteriana (Johnson, 1975).

2.7 Eutanásia

Dez animais de cada grupo experimental foram submetidos à eutanásia aos 14 e 28 dias após indução da PE. A eutanásia foi realizada por meio de dose letal de anestésico (Thiopental 150 mg/kg - Thiopentax; Cristalia, São Paulo, Brazil).

2.8 Processamento Tecidual

A mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes e acondicionadas em frascos contendo solução de formaldeído a 4% por um período de 48 horas. As hemimandíbulas esquerdas foram lavadas em água corrente por 12 horas e, colocadas para descalcificação em solução de EDTA à 10% por um período médio de 8 semanas, com trocas semanais. Estando as peças, suficientemente, descalcificadas estas foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Durante a inclusão, as peças foram posicionadas com a face vestibular paralela ao plano de corte. Os cortes foram realizados no sentido apico-oclusal, com o cuidado de sempre estarem no longo eixo do dente envolvendo as raízes mesial e distal. Cinco cortes semi-seriados com 4 µm de espessura foram corados pela técnica da hematoxilina/eosina (H&E) para análise histológica e histomética. Seis cortes adicionais de cada amostra foram submetidas ao método de imunoperoxidase indireta, usando os seguintes anticorpos primários: anti-tartrate-resistant acid phosphatase (anti-TRAP), anti-fator de necrose tumoral- α (anti-TNF- α), anti-interleucina-1 β (anti-IL-1 β). O processamento imuno-histoquímico foi realizado de acordo com Gusman et al. (2019).

2.9 Análises dos Resultados

2.9.1 Análise Histopatológica

A análise histopatológica foi efetuada por um histologista certificado, cego ao experimento (E.E) o qual avaliou os seguintes parâmetros: intensidade da resposta inflamatória local, extensão do processo inflamatório, padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca e padrão de estruturação do tecido ósseo da região de furca. Para cada parâmetro foi atribuído escore de 0 a 3. A análise histopatológica foi realizado de acordo com uma adaptação de Gusman et al. (2019).

2.9.2 Análise Histométrica de Porcentagem de Tecido Ósseo na Região de Furca (POF) e Porcentagem de Tecido Ósseo Necrosado na Região de Furca (PON)

As imagens coradas pela técnica de H&E foram capturados utilizando um sistema de captura de imagem acoplado no microscópio óptico. Para a determinação da Porcentagem de Tecido Ósseo na Região de Furca (POF) dos primeiros molares foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). Foi mensurado a Área Total da Furca (AF) e em seguida a Área Ocupada por Tecido Ósseo (AO), ambas em mm². Posteriormente, foi calculado a POF. A AF foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada a partir do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A partir desta linha seguiu-se todo o contorno da superfície externa do cimento situado entre as raízes. A AO teve o mesmo limite apical da AF, e a partir deste seguiu-se todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A POF foi calculada multiplicando-se AO por 100 e dividindo-se por AF ($POF = [AO \times 100] / AF$) (Anexo C). A POF de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador (D.J.R.G), calibrado e cego aos grupos experimentais em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados (Garcia et al., 2014; Gusman et al., 2019).

Para a determinação da Porcentagem de Tecido Osseo Necrosado na Região de Furca (PON) (E.E), a mesma região de interesse determinada para POF foi utilizada. Na AF foram delineadas as áreas constituídas por tecido ósseo necrosado (ON), em mm². PON foi calculada multiplicando-se ON por 100 e dividindo-se por AF ($PON = [ON \times 100] / AF$) (Araujo, 2017) (Anexo D).

2.9.3 Análise Imunoistoquímica

A seleção das secções imunoistoquímicas foi realizada por um examinador, certificado, calibrado e cego aos grupos experimentais. Para TRAP, foi contado o número de células imunoreativas (IR) ao biomarcador na AF. Para TNF- α e IL-1 β foi efetuada uma análise semi-quantitativa da imunomarcacção no ligamento periodontal e no osso alveolar, seguindo os critérios para o estabelecimento do padrão de imunomarcacção de Gusman et al. (2019): (escore 3) alto padrão de imunomarcacção ($\cong$ 3/4 das células imunoreativas por área), (escore 2) moderado padrão de imunomarcacção ($\cong$ 1/2 das células-IR por área), (escore 1) baixo padrão de imunomarcacção ($\cong$ 1/4 das células-IR por área) e (escore 0) padrão de imunomarcacção nulo (ausência total de células-IR).

3.9.4. Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil). Para a calibração da mensuração da PON e POF foram realizadas três mensurações as quais foram submetidas ao Teste Kappa. Os dados da análise histológica e imunoistoquímica foram submetidos ao teste de Análise de Variância de Kruskal Wallis e pós teste de Dunn. Os dados histométricos da PON e POF foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, em seguida foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA) a um critério e o pós teste de Tukey. O nível de significância dos testes foi de $p \leq 0.05$.

3 RESULTADOS

O poder do estudo foi calculado com os 160 animais e demonstrou-se com valor de 95% de confiabilidade.

3.1 Análise histológica

Nos grupos SPE (Tabela 1), referente à intensidade da resposta inflamatória local e à extensão do processo inflamatório, SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL apresentaram ausência de inflamação aos 14 e 28 dias (Figura 1 A, B, E, F, I, J, M e N). SPE-CIS/SS e SPE-CIS/ZOL apresentaram maior processo inflamatório quando comparados com SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$) prevalecendo uma inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias) que se estendia apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca (Figura 1 A-P).

Com relação ao padrão de estruturação do tecido conjuntivo na região de furca, SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL apresentaram moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso) aos 14 e 28 dias (Figura 1 A, B, E, F, I, J, M e N). SPE-CIS/SS e SPE-CIS/ZOL apresentaram maior desestruturação do tecido conjuntivo na região de furca quando comparados com SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$), prevalecendo moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas (Figura 1 A-P).

Com relação ao padrão de estruturação do tecido ósseo da região de furca, SPE-SS/SS apresentou trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea aos 14 e 28 dias (Figura 1 A, E, I e M). O mesmo resultado ocorreu em SPE-SS/ZOL aos 14 dias (Figura 1 B e F), porém, aos 28 dias, o tecido se apresentava mais desestruturado que SPE-SS/SS no mesmo período ($p \leq 0,05$), uma vez que foram observadas áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos (Figura 1 J e N). SPE-CIS/SS apresentou-se com trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos

(Figura 1 C, G, K e O) aos 14 e 28 dias. SPE-CIS/ZOL apresentou maior desestruturação do tecido ósseo da região de furca quando comparado com SPE-SS/SS, SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$), sendo observado áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos (Figura 1 A-P).

Nos grupos PE (Tabela 2), referente à intensidade do processo inflamatório, PE-SS/SS apresentou inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias) aos 14 dias e inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias) aos 28 dias (Figura 2 A, E, I e M). PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior intensidade da resposta inflamatória local quando comparados com PE-SS/SS ($p \leq 0,05$), apresentando inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias) aos 28 dias (Figura 2 A-P).

Com relação à extensão do processo inflamatório, PE-SS/SS apresentou um processo inflamatório que se estendia por todo o tecido conjuntivo da região de furca aos 14 e 28 dias (Figura 2 A, E, I e M). PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior extensão do processo inflamatório quando comparados com PE-SS/SS ($p \leq 0,05$), que se estendia por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca aos 14 e 28 dias (Figura 2 A-P).

Com relação ao padrão de estruturação do tecido conjuntivo e ósseo da região de furca, PE-SS/SS apresentou pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas, com trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos aos 14 e 28 dias (Figura 2 A, E, I e M). PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior desestruturação do tecido conjuntivo e ósseo da região de furca quando comparados com PE-SS/SS ($p \leq 0,05$), prevalecendo desestruturação tecidual severa com áreas de necrose no tecido conjuntivo e áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos (Figura 2 A-P).

3.2 Análise histométrica de POF e PON

O teste Kappa indicou 94% de concorância nas medidas de POF e 91% de PON intraexaminador.

Os resultados de POF estão representados na tabela 3, Figura 1 (A-D e I-L) (SPE) e Figura 2 (A-D e I-L) (PE). Nos animais SPE, em SPE-SS/SS e SPE-CIS/SS, a POF se manteve com uma porcentagem que condiz com a integridade do osso alveolar, não havendo perda ou formação óssea em todos os períodos experimentais. No entanto, na análise intergrupo, SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL apresentaram maior POF quando comparados com SPE-SS/SS e SPE-CIS/SS aos 28 dias ($p \leq 0,05$). SPE-SS/ZOL apresentou maior POF quando comparado a SPE-CIS/ZOL aos 28 dias ($p \leq 0,05$). Com relação à análise intragrupo, SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL apresentaram maior POF aos 28 dias comparado com 14 dias ($p \leq 0,05$).

Nos animais com PE, foi observado que PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL apresentaram maior POF quando comparados com PE-SS/SS e PE-CIS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). PE-CIS/SS apresentou menor POF quando comparado a PE-SS/SS aos 28 dias ($p \leq 0,05$).

Os resultados de PON estão representados na tabela 4, Figura 1 (E-H e M-P) (SPE) e Figura 2 (E-H e M-P) (PE). Nos animais SPE, SPE-SS/ZOL, SPE-CIS/SS e SPE-CIS/ZOL apresentaram maior PON comparados com SPE-SS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL apresentaram maior PON quando comparados a SPE-CIS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). Além disso, SPE-CIS/ZOL apresentou maior PON quando comparado com SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$).

Nos animais com PE, PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior PON quando comparados a PE-SS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL apresentaram maior PON quando comparado com PE-CIS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). Além disso, PE-CIS/ZOL apresentou maior PON comparado com PE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$).

3.3 Análise imunoistoquímica

As técnicas imunoistoquímicas usadas para detectar TRAP, TNF- α e IL-1 β apresentaram alta especificidade na detecção dessas proteínas. A imunomarcagem apresentou-se como aquela de coloração acastanhada confinada ao compartimento citosólico para TRAP, ou predominantemente no compartimento citosólico das células e em menor escala à matriz

extracelular para TNF- α e IL-1 β . Todos os grupos apresentaram imunomarcacção para TRAP (Figura 3 A-D), TNF- α (Figura 3 E-H) e IL-1 β (Figuras 3 I-L) em todos os períodos de análise. A imunomarcacção para TRAP foi observada predominantemente em osteoclastos, enquanto TNF- α e IL-1 β foram observadas predominantemente em células inflamatoras e fibroblastos.

Os resultados das células TRAP-positivas estão apresentados na tabela 5 e na Figura 3 aos 14 dias (A-D) nos animais com PE. Nos animais SPE, não houve diferença entre os grupos. Nos animais com PE, PE-SS/ZOL apresentou menor quantidade de células TRAP-positivas quando comparados com PE-SS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior quantidade de células TRAP positivas quando comparados com PE-SS/SS aos 14 dias ($p \leq 0,05$). PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior quantidade de células TRAP-positivas quando comparados com PE-SS/ZOL aos 14 dias ($p \leq 0,05$). PE-CIS/ZOL apresentou maior quantidade de células TRAP-positivas quando comparado com PE/SS-ZOL aos 28 dias ($p \leq 0,05$). PE-CIS/ZOL apresentou maior quantidade de células TRAP-positivas quando comparado com PE-CIS/SS aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$).

As mdias e desvios interquartis da variação dos escores da imunomarcacção de TNF- α e IL-1 β , aos 14 e 28 dias, de todos os grupos, estão apresentados na Figura 4. Os padrões de imunomarcacção para TNF- α aos 28 dias, dos grupos com PE, estão representados na Figura 3 (E-H) e para IL-1 β na Figura 3 (I-L). Nos animais SPE, SPE-CIS/SS e SPE-CIS/ZOL apresentaram maior padrão de imunomarcacção para TNF α e IL-1 β quando comparados com SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias ($p \leq 0,05$). Nos animais com PE, PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior padrão de imunomarcacção quando comparados com PE-SS/SS aos 28 dias ($p \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Um modelo apropriado é capaz de fornecer mais informações do que estudos *in vitro*, onde interações celulares complexas são tipicamente ignoradas, ou estudos em humanos em que mecanismos são difíceis de serem provados (Graves, 2008). Em periodontia, a utilização de modelos experimentais animais bem padronizados e capazes de mimetizar com certa precisão o cenário clínico, tem contribuído significativamente não somente para a elucidação de formas de prevenção, entendimento da patogênese e proposição de tratamentos da PE (Almeida et al., 2007; Almeida et al., 2008a, 2008b; Bezerra et al., 2002; Graves, 2008; Graves & Cochran, 2003; Kesavalu et al., 2007; Molon, Avila & Cirelli, 2013; Molon et al., 2014; Polak et al., 2009), mas também para a elucidação da influência modificações sistêmicas em tecidos periodontais não acometidos pela PE (Gusman et al., 2019; Nieh et al., 1996). Este estudo foi conduzido em sobre os princípios da “reduction”, “refinement” e “replacement” para o uso dos animais em laboratório.

Modelos que avaliaram, isoladamente, a CIS ou ZOL, reportaram efeitos prejudiciais das medicações sobre os tecidos periodontais (Araujo, 2017; Gusman et al., 2019). No cenário clínico, comumente, a combinação de CIS e ZOL é empregada para tratamento de neoplasias osteotrópicas (Okamoto et al., 2013; Winter et al., 2013), contudo, sem evidências do impacto desse tratamento sobre tecidos periodontais saudáveis ou acometidos por DP. Ainda que seja reportado aumento na taxa de sucesso no tratamento de câncer, casos específicos não-tratáveis demandam cuidados paliativos com objetivo de reduzir estresse adicional ao paciente (Howie & Peppercorn 2013), tais como a ONMB. Portanto, visto que os bisfosfonatos podem permanecer incorporados ao tecido ósseo por até 10 anos (Di Fede et al. 2018), conhecer os efeitos da combinação de CIS e ZOL é a melhor ferramenta para prevenir a ocorrência da ONMB e assegurar bem-estar para os pacientes, independente dos resultados do tratamento do câncer.

Nos animais SPE, SPE-CIS/SS e SPE-CIS/ZOL apresentaram um significativo aumento na intensidade e extensão da resposta inflamatória, seguido de maior desestruturação do tecido conjuntivo da região de furca. Estes achados são suportados pelos resultados da análise imunoistoquímica, na qual SPE-CIS/SS e SPE-CIS/ZOL apresentaram um

significativo aumento no padrão de imunomarcacão para TNF- α e IL-1 β quando comparados com SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias.

Ainda, que SPE-CIS/SS tenha apresentado um processo inflamatório mais exacerbado em ambos os períodos quando comparado com SPE-SS/SS não houve diferença em relação à POF, o que significa não ter ocorrido perda óssea, haja visto que o osso alveolar ocupa aproximadamente 81-85% da área total da furca, e remanescendo 15-19% ocupada por ligamento periodontal em ratos Wistar saudáveis (*R. norvegicus, albinus*) (Gusman et al., 2019).

Esses resultados experimentais corroboram com o estudo de Gusman et al. (2019), uma vez que os tecidos periodontais saudáveis apresentaram processo inflamatório mais exacerbado nos grupos que tiveram administração de CIS comparado com SS. Além disto, os mesmos achados corroboram, em parte, com os achados clínicos de Mazzeo et al. (2009), que observaram aumento do sangramento a sondagem durante a terapia com um quimioterápico 5-fluorouracil, que foi revertido no final do tratamento.

Os exatos mecanismos de ação de CIS não estão totalmente elucidados. A CIS parece inibir os processos celulares fundamentais levando a danos no DNA (Dasari & Tchounwou, 2014; Longley, Harkin, & Johnston, 2003). Além das células tumorais serem alvo, outros tecidos caracterizados pela rápida divisão celular, como medula óssea e mucosa gastrointestinal são afetadas significativamente. Outro tecido que tem uma alta taxa de divisão celular é o epitélio juncional (Groeger & Meyle, 2015; Schroeder & Listgarten, 1997). Desta forma, os agentes antineoplásicos afetam a divisão celular em sua camada basal, resultando em um epitélio mais fino, mais susceptível a ulcerações. O epitélio juncional tem papel central na defesa dos tecidos periodontais contra o desafio microbiano e a integridade desse epitélio é essencial para a homeostase periodontal (Groeger & Meyle, 2015; Tsukamoto et al., 2012). Sobre este tema, Gusman et al. (2019) observaram que a utilização dos quimioterápicos 5-FU e CIS promoveram uma destruição no epitélio juncional em ratos SPE.

Vale ressaltar que a mucosite oral induzida por quimioterapia pode ser causada por mudanças que afetam o ambiente bucal, como diminuição no volume de saliva, alteração dos constituintes salivares e a citotoxicidade direta na mucosa devido à secreção salivar de quimioterápicos via seu mecanismo de ação sistêmico e tópico (Mazzeo et al., 2009). Da

mesma forma, foi observado que a depuração bacteriana é reduzida quando o fluxo salivar diminui, resultando no acúmulo de biofilme contendo patógenos periodontais (Ciancio, 2005; Mizutani et al., 2015). Portanto, é plausível inferir que esses mecanismos poderiam ter contribuído para o aumento da inflamação periodontal observada nos animais que receberam a CIS/SS quando comparados com SS/SS.

Com relação a SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL, houve uma diminuição do espaço do ligamento periodontal, uma vez que a POF foi respectivamente $93.37\% \pm 1.37$ e $89.64\% \pm 1.68$ aos 28 dias. Isso pode ser explicado uma vez que o ZOL tem um discreto efeito anabólico na atividade dos osteoblastos (Carbonare et al., 2017) e um efeito inibitório da diferenciação e da atividade dos osteoclastos (Haung et al., 2019).

Embora, seja descrito na literatura que o ZOL aumente consistentemente a densidade óssea, alterações no volume ósseo (medidas realizadas em biópsia óssea transilíaca) não são significativas na maioria dos estudos (Chavassieux et al., 1997). O aumento da densidade óssea é, predominantemente, devido à mineralização adicional da matriz óssea, à medida que mais moléculas de água são substituídas por minerais (Boivin et al., 2000). Ao contrário dos osteoclastos, os osteoblastos não são diretamente inibidos pelo ZOL e, durante os primeiros 3 a 6 meses, o osso continua a preencher as cavidades de reabsorção que estavam presentes quando a administração do medicamento foi iniciada, aumentando modestamente o volume ósseo (Chavassieux et al., 1997), o que foi constatado neste estudo pelo aumento da POF em SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL.

Com relação a PON, o presente estudo identificou áreas de osso não-vital nos grupos SPE, com a seguinte ordem de diferença estatística: SPE-SS/SS (0.80 ± 0.29 e 0.78 ± 0.19) < SPE-CIS/SS (5.26 ± 0.68 e 6.30 ± 0.31) < SPE-SS/ZOL (8.92 ± 0.92 e 11.42 ± 1.90) < SPE-CIS/ZOL (13.27 ± 1.74 e 16.29 ± 1.16) ($p < 0,05$), aos 14 e 28 dias. Nos animais que receberam CIS esse aumento de tecido ósseo não vital pode ser explicado pela citotoxicidade da droga. No entanto, nos animais que receberam ZOL, o efeito sobre a remodelação óssea impede que ocorra a eliminação do tecido ósseo inviável e das microfraturas ósseas, comuns no tecido ósseo alveolar, que apresenta uma alta taxa de renovação especialmente em função da atividade mastigatória, que para promover a dissipação das forças, necessita de uma resposta adaptativa constante do osso alveolar (Araujo, 2017). Por isso, nos animais que receberam ambas as drogas os dois mecanismos podem ter sido combinados.

Com relação aos grupos PE, PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram significativo aumento na intensidade da resposta inflamatória quando comparados com PE-SS/SS aos 28 dias. Estes resultados são suportados pelo aumento na expressão de TNF- α e IL-1 β nesses grupos quando comparados com PE-SS/SS no mesmo período de comparação. Adicionalmente, PE-SS/ZOL, PE-CIS/SS e PE-CIS/ZOL apresentaram maior extensão do processo inflamatório e maior desestruturação dos tecidos conjuntivo e ósseo na região de furca quando comparados com PE-SS/SS aos 14 e 28 dias.

A exacerbação do processo inflamatório mediante a influência dos quimioterápicos durante a progressão da PE em animais está em evidência na literatura (Garcia et al., 2014, 2015; Gusman et al., 2019). Estes estudos relatam o aumento da intensidade e extensão do processo inflamatório e maior desestruturação do tecidos conjuntivo e ósseo na região de furca em ratos que receberam a administração de quimioterápicos. Além do mais, Gusman et al. (2019) relataram que a perda óssea nestes animais progride de maneira mais rápida, o que corrobora com os resultados deste estudo, uma vez PE-CIS/SS apresentou menor POF quando comparado a PE-SS/SS.

É conhecido que TNF- α e IL-1 β estimulam a produção de RANKL, que induz a expressão de células TRAP-positivas através da via autócrina e parácrina (Kwan et al., 2004). Além disso, vias independentes de RANKL podem estimular e aumentar a atividade osteoclástica (Kobayashi et al 2000). Pode-se observar menor POF em PE-CIS/SS aos 28 quando comparado com PE-SS/SS. Apesar de não ter havido diferença no número de células TRAP-positivas comparado a PE-SS/SS aos 28 dias, a citotoxicidade da droga e um ambiente complexo com microorganismos e inflamação podem estimar maior atividade osteoclástica.

Com relação aos animais com PE que receberam a administração de ZOL (PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL), foi observado a exacerbação do processo inflamatório quando comparados a PE-SS/SS aos 28 dias. Contudo, apesar da intensa inflamação local, ambos os grupos apresentaram perda óssea mínima, inconsistente com os danos causados pela PE. Nestes grupos, PE-SS/ZOL apresentou menor número de células TRAP-positivas, enquanto PE-CIS/ZOL apresentou maior número de células TRAP-positivas quando comparados com PE-SS/SS aos 14 e 28 dias. Estes achados apontam diminuição na diferenciação osteoclástica quando o ZOL é administrado isoladamente (com placebo), como previsto na literatura (Huang et al., 2019). No entanto, na administração somente da CIS (com placebo), houve um

aumento da diferenciação osteoclástica aos 14 dias comparado com PE-SS/SS e PE-SS/ZOL. Nesse contexto, pode ser inferido que a CIS induz o aumento da quantidade de células TRAP-positivas, justificando o aumento também em PE-CIS/ZOL, no entanto, a atividade reabsortiva é reduzida em decorrência do mecanismo da diminuição da função osteoclástica (Huang et al., 2019).

Com relação à PON, a diferença da quantidade de tecido ósseo não vital é expressa por PE-SS/SS (2.00 ± 0.47 e 2.38 ± 0.40) < PE-CIS/SS (9.24 ± 1.41 e 13.44 ± 1.12) < PE-SS/ZOL (15.68 ± 2.20 e 29.58 ± 3.26) < PE-CIS/ZOL (40.36 ± 5.19 e 45.40 ± 7.51) aos 14 e 28 dias. A PON em PE-CIS/SS pode ser um evento decorrente da citotoxicidade da CIS potencializada em um microambiente inflamado na presença de bactérias e seus produtos enzimáticos. Nos grupos que receberam ZOL, a maior quantidade de tecido ósseo não vital quando comparado com os demais grupos é justificada pela diminuição da atividade osteoclástica, a qual afeta negativamente o processo de remodelação, que é de fundamental importância para manutenção da homeostase do osso alveolar frente a condições dinâmicas de oclusão do sistema estomatognático. Desta maneira, ao combinar as medicações (PE-CIS/ZOL), seus efeitos prejudiciais parecem ser potencializados e maior PON foi observada quando comparado com os demais grupos, aumentando o risco para desenvolvimento da ONMB.

A interpretação dos dados apresentados pelo presente estudo elucida alguns mecanismos pelos quais a associação de CIS e ZOL amplificam os danos causados aos tecidos periodontais saudáveis e acometidos pela PE quando comparados a sua administração com placebo. No cenário clínico, fortes evidências indicam que a necessidade de exodontia decorrente de distintas causas (e.g. cárie, progressão da periodontite, trauma, dentre outros) combinado ao trauma e/ou inflamação/infecção são fatores chave para o desenvolvimento da ONMB. Sabendo-se que a ONMB, ainda, que não muito incidente é potencialmente intratável (Song, 2019), e os dados apresentados pelo presente estudo pré-clínico inferem que em pacientes sob uso combinado de CIS e ZOL, todos os esforços devem ser direcionados à manutenção e consequente prevenção da instalação da ONMB.

Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o uso combinado de CIS e ZOL é potencial fator de risco para desenvolvimento da ONMB, tanto em periodonto saudável quanto em periodonto acometido pela PE.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento - 001

Ao departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de São Paulo – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

À Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, J. C., Gomes, E. P., Fonseca-Silva, T., Velloso, N. A., Vieira, L. T., Fernandes, M. F., Santos, S.H., Neto, J.F., De-Paula, A. M., & Guimarães, A. L. (2013) Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. *Journal of Periodontal Research*, **48**, 632-637. doi: 10.1111/jre.12049
- Alani, A., & Seymour, R. (2014). Systemic medication and the inflammatory cascade. *Periodontology 2000*, **64**, 198–210. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00454.x
- Allen, M. R., & Burr, D. B. (2009). The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **67**, 61-70. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.007
- Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Oschiiwa, M., & Garcia, V. G. (2008a). In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *Journal of Periodontology*, **79**, 1081-1088. doi: 10.1902/jop.2008.070456
- Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Oshiiwa, M., & Garcia, V. G. (2008b). Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *Journal of Periodontology*, **79**, 2156-2165. doi: 10.1902/jop.2008.080103
- Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Oshiiwa, M., & Garcia, V. G. (2007). Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, **78**, 566-575. doi: 10.1902/jop.2007.060214
- Araújo, A. A., Souza, G. L., Souza T. O., Brito, G. A. C., Aragão, K. S., Medeiros, C. A. X., Lourenço, Y., Alves, M. S. C. F. A., & Araújo Júnior, R. F. (2013). Olmesartan decreases IL-1 β and TNF- α levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **386**, 875-884. doi: 10.1007/s00210-013-0886-8

- Araujo, NJ. Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional. 2017. 100 f. Dissertação (mestrado em periodontia). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.
- Arias, J. L. (2008). Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. *Molecules*, **13**, 2340-2369. doi: 10.3390/molecules13102340
- Bezerra, M.M., Brito, G.A.C., Ribeiro, R.A., & Rocha, F.A.C. (2002). Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **35**, 613-616. doi: 10.1590/S0100-879X2002000500015
- Boivin, G. Y., Chavassieux, P. M., Santora, A. C., Yates, J., & Meunier, P. J. (2000). Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone*, **27**, 687–694. doi: 10.1016/s8756-3282(00)00376-8
- Chavassieux, P. M., Arlot, M. E., Reda, C., Wei, L., Yates, A. J., & Meunier, P. J. (1997). Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *The Journal of Clinical Investigation*, **100**, 1475–1480. doi: 10.1172/JCI119668
- Choi, Y. J., Lee, S. H., Lee, J. L., Ahn, J. H., Lee, K. H., You, D., Hong, B., Hong, J. H., & Ahn, H. (2015). Phase II study of pemetrexed in combination with cisplatin in patients with advanced urothelial cancer: the PECULIAR study (KCSG 10-17). *British Journal of Cancer*, **112**, 260-265. doi: 10.1038/bjc.2014.591
- Ciancio, S. G. (2005). Medications: a risk factor for periodontal disease diagnosis and treatment. *Journal of Periodontology*, **76**, 2061–2065. doi: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2061
- Coleman, R.E. (2005). Bisphosphonates in breast cancer. *Annals of Oncology*, **16**:687–695.
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (2015). Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa. Retrieved from http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf

- Dalle Carbonare, L., Mottes, M., Malerba, G., Mori, A., Zaninotto, M., Plebani, M., Dellantonio, A., & Valenti, M. T. (2017). Enhanced Osteogenic Differentiation in Zoledronate-Treated Osteoporotic Patients. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1261. doi: 10.3390/ijms18061261
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 5, 364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- Di Fede, O., Panzarella, V., Mauceri, R., Fusco, V., Bedogni, A., Lo Muzio, L., Sipmo Onj Board, & Campisi, G. (2018). The Dental Management of Patients at Risk of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Paradigm of Primary Prevention. *BioMed research international*, 2018, 2684924. doi: 10.1155/2018/2684924
- Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S. (2008). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, 83, 1032-1045. doi: 10.4065/83.9.1032
- Du Bois, D., & Du Bois, E. F. (1989). A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Nutrition*, 17, 303-311.
- Ervolino, E., Statkiewicz, C., Toro, L. F., Mello-Neto, J. M., Cavazana, T. P., Issa, J., Dornelles, R., Almeida, J. M., Nagata, M., Okamoto, R., Casatti, C. A., Garcia, V. G., & Theodoro, L. H. (2019). Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone*, 120, 101–113. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014
- Fernandes, L. A., Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Martins, T. M., Okamoto, T., & Garcia, V. G. (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *Journal of Clinical Periodontology*, 36, 219-228. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01355.x
- Food and Drug Administration (2005). Dose calculator: conversion chemotherapy of human to animals. Retrieved from <http://www.accessdata.fda.gov>
- Garcia, V. G., Longo, M., Gualberto Júnior, E. C., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Ervolino, E., & Theodoro, L. H. (2014). Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers

in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, **49**, 584-594. doi: 10.1111/jre.12138

Garcia, V. G., Novaes, V. C., Almeida J. M., Longo, M., Ervolino, E., Bomfim, S. R., & Theodoro, L. H. (2015). Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Supportive Care in Cancer*, **23**, 2007-2017. doi: 10.1007/s00520-014-2563-y

Gomes, E. P., Aguiar, J. C., Fonseca-Silva, T., Dias, L. C., Moura-Boas, K. P., Roy, A., Velloso, N. A., Rodrigues-Neto, J. F., De-Paula, A. M., & Guimarães, A. L. (2013). Diazepam reverses the alveolar bone loss and hippocampal interleukin-1beta and interleukin-6 enhanced by conditioned fear stress in ligature-induced periodontal disease in rats. *Journal of Periodontal Research*, **48**, 151-158. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01515.x

Graves, D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, **79**, 1585–1591. doi: 10.1902/jop.2008.080183

Graves, D.T., & Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **74**, 391–401. doi: 10.1902/jop.2003.74.3.391

Groeger, S. E., & Meyle, J. (2015). Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontology 2000*, **69**, 46–67. doi: 10.1111/prd.12094

Guchelaar, H. J., Vermes, I., Koopmans, R. P., Eutelingsperger, C. P., & Haanen, C. (1998). Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **42**, 77-83.

Guggenheimer, J., Verbin, R. S., Appel, B. N., & Schmutz, J. (1977). Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, **44**, 58-63.

- Gusman, D. J. R. (2017). Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à quimioterapia: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.
- Gusman, D., Ervolino, E., Theodoro, L. H., Garcia, V. G., Nagata, M., Alves, B., de Araujo, N. J., Matheus, H. R., & Almeida, J. M. (2019). Antineoplastic agents exacerbate periodontal inflammation and aggravate experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, **46**, 457–469. doi:10.1111/jcpe.13101
- Half, E., & Arber, N. (2009). Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **10**, 211-219. doi: 10.1517/14656560802560153
- Havelka, A. M., Berndtsson, M., Olofsson, M. H., Shoshan, M. C., & Linder, S. (2007). Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **7**, 1035-1039. doi: 10.2174/138955707782110196
- Hortobagyi, G. N. (2005). Progress in the management of bone metastases: one continent at a time? *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 3299–3301. doi: 10.1200/JCO.2005.11.931
- Howie, L., & Peppercorn, J. (2013). Early palliative care in cancer treatment: rationale, evidence and clinical implications. *Therapeutic advances in medical oncology*, **5**, 318–323. doi: 10.1177/1758834013500375.
- Huang, X., Huang, L., Cheng, Y., Li, F., Zhou, Q., Wu, C. Hong, W. (2019). Zoledronic acid inhibits osteoclast differentiation and function through the regulation of NF-κB and JNK signalling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, **44**, 582-592. doi: 10.3892/ijmm.2019.4207
- Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2013). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Retrieved from <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>
- Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2019). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Retrieved from <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

- Johnson, J. H. (1975). Effects of local irritation and dextran and sulfat administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, **10**, 332-345. doi: 10.1111/j.1600-0765.1975.tb00042.x
- Kang, B., Cheong, S., Chaichanasakul, T., Bezouglaia, O., Atti, E., Dry, S. M., Pirih, F. Q., Aghaloo, T. L., & Tetradis, S. (2013). Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, **28**:1631-1640. doi: 10.1002/jbmr.1894
- Kesavalu, L., Sathishkumar, S., Bakthavatchalu, V., Matthews, C., Dawson, D., Steffen, M., & Ebersole, J. L. (2007). Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infection and immunity*, **75**, 1704-1712. doi: 10.1128/IAI.00733-06
- Kim, S. S., Jackson-Boeters, L., Darling, M. R., Rieder, M. J., & Hamilton, D. W. (2013). Nifedipine induces periostin expression in gingival fibroblasts through TGF-beta. *Journal of Dental Research*, **92**, 1022-1028. doi: 10.1177/0022034513503659
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T. J., & Suda, T. (2000). Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *The Journal of Experimental Medicine*, **191**, 275-286. doi: 10.1084/jem.191.2.275
- Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D., & Fortun, Y. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **15**, 49-60. doi: 10.1016/j.cytogfr.2003.10.005
- Linardou, H., Pentheroudakis, G., Varthalitis, I., Gogas, H., Pectasides, D., Makatsoris, T., Fountzilas, G., & Bafaloukos, D. (2015). Predictive biomarkers to chemotherapy in patients with advanced melanoma receiving the combination of cisplatin--vinblastine--temozolomide (PVT) as first-line treatment: a study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HECOG). *Anticancer Research*, **35**, 1105-1113.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, **3**, 330-338. doi: 10.1038/nrc1074

- Lorch, J. H., Goloubeva, O., Haddad, R. I., Cullen, K., Sarlis, N., Tishler, R., Tan, M., Fasciano, J., Sammartino, D. E., Posner, M. R., & TAX 324 Study Group. (2011). Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, **12**, 153-159. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70279-5
- Mazzeo, M. A., Linares, J. A., Campos, M. L., Busamia, B. E., Dubersarsky, C., Lavarda, M., & Finkelberg, A. B. (2009). Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, **14**, E108–E113.
- Mcguire, D. B. (2002). Mucosal tissue injury in cancer therapy: more than muscositis and mouthwash. *Cancer Practice* **10**, 179-191. doi: 10.1046/j.1523-5394.2002.104009.x
- Mihai, R. (2015). Diagnosis, treatment and outcome of adrenocortical cancer. *The British Journal of Surgery*, **102**, 291-306. doi: 10.1002/bjs.9743
- Molon, R. S., Avila, E. D., & Cirelli, J. A. (2013). Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, **4**, 211-218. doi: 10.1111/jicd.12018
- Molon, R. S., Avila, E. D., Boas Nogueira, A. V., Chaves de Souza, J. A., Avila-Campos, M. J., Andrade, C. R., & Cirelli, J. A. (2014). Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *Journal of Periodontology*, **85**, 465-477. doi: 10.1902/jop.2013.130225
- Nakasato, T., Izumisawa, M., Akahane, A., Kikuchi, K., Ehara, S., Shoji, S., Kogi, S., Mizuki, H., & Sugiyama, Y. (2012). Combined intra-arterial infusion and systemic chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Japanese Journal of Radiology*, **30**, 752-761. doi: 10.1007/s11604-012-0122-3
- Nakib, N., & Ashrafi, S. S. (2011). Drug-induced gingival overgrowth. *Disease-a-Month*, **57**, 225-230. doi: 10.1016/j.disamonth.2011.03.010

- Nassar, P. O., Nassar, C. A.; Guimarães, M. R., Aquino, S. G., Andia, D. C., Muscara, M. N., Spolidorio, D. M., Rossa Jr., C., & Spolidorio, L. C. (2009). Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*, **44**, 479-488. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01143.x
- NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *The Journal of Physiology* **588**, 2519-2521. doi: 10.1113/jphysiol.2010.192278
- Nieh, S., Fu, E., Chang, H. L., Wang, S. L., & Wikesjö, U. M. (1996). Histopathologic alterations of periodontium in cyclosporin-treated rats. Is the periodontium a target tissue for the drug? *Journal of Clinical Periodontology*, **23**, 730–736. doi: 10.1111/j.1600-051x.1996.tb00602.x
- Okamoto, S., Jiang, Y., Kawamura, K., Shingyoji, M., Fukamachi, T., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K., Kobayashi, H., & Tagawa, M. (2013). Zoledronic acid produces combinatory anti-tumor effects with cisplatin on mesothelioma by increasing p53 expression levels. *PLoS One*, **8**, e60297. doi: 10.1371/journal.pone.0060297
- Pang, S. K., Yu, C. W., Au-Yeung, S. C. F., & Ho, Y. P. (2007). DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **363**, 235–240. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.172
- Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E. I., & Hourii-Haddad, Y. (2009). Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: Bone loss and host response. *Journal of Clinical Periodontology*, **36**, 406-410. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01393.x
- Preshaw, P. M. (2013). Oral contraceptives and the periodontium. *Periodontology 2000* **61**, 125-159. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00399.x
- Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., O’Ryan, F., & American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (2014). American Association of Oral and Maxillofacial surgeons position paper on medication-related

- osteonecrosis of the jaws - 2014 update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **72**, 1938-1956. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031
- Russell, R. G. (2011). Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*, **49**, 2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022
- Saltz, L. B., & Kemeny, N. E. (1996). Adjuvant chemotherapy of colorectal cancer. *The Oncologist*, **1**, 22-29.
- Schroeder, H. E., & Listgarten, M. A. (1997). The gingival tissues: The architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000*, **13**, 91–120. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00097.x
- Seymour, R. A. (2006). Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000* **40**, 120-129. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00137.x
- Song M. (2019). Dental care for patients taking antiresorptive drugs: a literature review. *Restorative dentistry & endodontics*, **44**, e42. doi: 10.5395/rde.2019.44.e42
- Spolidorio, L. C., Nassar, P. O., Nassar C. A., Spolidorio, D. M., & Muscara, M. N. (2007). Conversion of immunosuppressive monotherapy from cyclosporin A to tacrolimus reverses bone loss in rats. *Calcified Tissue International*, **81**, 114–123. doi: 10.1007/s00223-007-9040-2
- Surendiran, A., Balamurugan, N., Gunaseelan, K., Akhtar, S., Reddy, K.S., & Adithan, C. (2010). Indian Adverse drug reaction profile of cisplatin-based chemotherapy regimen in a tertiary care hospital in India: an evaluative study. *Indian Journal of Pharmacology*, **42**, 40-43. doi: 10.4103/0253-7613.62412
- Taylor 4th, S. G., Murthy, A. K., Vannetzel, J. M., Colin, P., Dray, M., Caldarelli, D. D., Shott, S., Vokes, E., Showel, J. L., & Hutchinson, J. C. (1994). Randomized comparison of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil infusion followed by radiation versus concomitant treatment in advanced head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **12**, 385-395. doi: 10.1200/JCO.1994.12.2.385
- Theodoro, L. H., Longo, M., Ervolino, E., Duque, C., Ferro-Alves, M. L., Assem, N. Z., Louzada, L. M., & Garcia, V. G. (2016). Effect of low-level laser therapy as an adjuvant

- in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. *Journal of Periodontal Research*, **51**, 669-680. doi: 10.1111/jre.12347
- Tsukamoto, Y., Usui, M., Yamamoto, G., Takagi, Y., Tachikawa, T., Yamamoto, M., & Nakamura, M. (2012). Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *Journal of Periodontal Research*, **47**, 750-757. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01490.x
- Vermorken, J. B., Peyrade, F., Krauss, J., Mesía, R., Remenar, E., Gauler, T. C., Keilholz, U., Delord, J. P., Schafhausen, P., Erfán, J., Brümmendorf, T. H., Iglesias, L., Bethe, U., Hicking, C., & Clement, P.M. (2014). Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in ecurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Annals of Oncology*, **25**, 682-688. doi: 10.1093/annonc/mdu003
- Wang, D. & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, **4**, 307-320. doi: 10.1038/nrd1691
- Winter, M. C., Wilson, C., Syddall, S. P., Cross, S. S., Evans, A., Ingram, C. E., Jolley, I. J., Hatton, M. Q., Freeman, J. V., Mori, S., Holen, I., & Coleman, R. E. (2013). Neoadjuvant chemotherapy with or without zoledronic acid in early breast cancer - a randomized biomarker pilot study. *Clinical Cancer Research*, **19**, 2755-2765. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3235
- Zhang, J., Liu, L., Gong, Y., Zheng, X., Yang, M., Cui, J., & Shen, S. (2009). Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum(II) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 2322-2327. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.04.005
- Zhao, Y. Y., Xue, C., Hou, X., Liao, H., Li, S., Zhao, H. Y., Huang, Y., Chen, L. K., Xu, F., Liu, J. L., & Zhang, L. (2011). Changes of bone resorption marker (NTX) in chemotherapy plus zoledronic acid versus chemotherapy alone for nasopharyngeal cancer patients with bone metastases. *European Journal of Cancer*, **47**, 848-853. doi: 10.1016/j.ejca.2010.12.004

Tabela 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo em ratos sem indução da periodontite experimental nos diferentes grupos e períodos experimentais.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA								
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES GRUPOS EXPERIMENTAIS							
	SPE-SS/SS		SPE-SS/ZOL		SPE-CIS/SS		SPE-CIS/ZOL	
	14d	28d	14d	28d	14d	28d	14d	28d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL								
1) ausência de inflamação	100%	100%	100%	80%	40%	40%	-	-
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	20%	60%	60%	100%	100%
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-	-	-	-	-
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana	1	1	1	1	2*	2*	2*	2*
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO								
1) ausência de inflamação	100%	100%	100%	80%	40%	40%	-	-
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	-	-	20%	60%	60%	100%	100%
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	-	-	-	-	-	-	-	-
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana	1	1	1	1	2*	2*	2*	2*
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA								
1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	100%	100%	100%	80%	40%	40%	-	-
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	20%	60%	60%	100%	100%
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	-	-	-	-	-
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	-	-	-	-	-	-	-	-
Mediana	1	1	1	1	2*	2*	2*	2*
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA								
1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	100%	100%	60%	40%	40%	40%	-	-
2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	-	-	40%	40%	-	-
3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	-	-	-	-	20%	20%	40%	20%
4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	-	-	40%	60%	-	-	60%	80%
Mediana	1	1	1	4 [‡]	2	2	4 [†]	4 [†]

Análise inter-grupo: *Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias. [†] Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS/SS, SPE-CIS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias.

[‡]Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS/SS e SPE-CIS/SS aos 28 dias. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$).

Tabela 2: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo em ratos com periodontite experimental induzida nos diferentes grupos e períodos experimentais.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA								
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES GRUPOS EXPERIMENTAIS							
	PE-SS/SS		PE-SS/ZOL		PE-CIS/SS		PE-CIS/ZOL	
	14d	28d	14d	28d	14d	28d	14d	28d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL								
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-	-	-	-	-
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias)	40%	60%	-	-	-	-	-	-
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias)	60%	40%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Mediana	4	3	4	4*	4	4*	4	4*
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO								
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	40%	60%	-	-	-	-	-	-
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	60%	40%	-	40%	-	20%	-	-
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	-	-	100%	60%	100%	80%	100%	100%
Mediana	3	2	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA								
1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	-	-	-	-	-	-	-	-
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	-	-	-	-	-
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	100%	100%	40%	-	40%	-	-	-
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	-	-	60%	100%	60%	100%	100%	100%
Mediana	3	3	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA								
1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	-	-	-	-	-	-	-	-
2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	-	-	-	-	-	-
3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	100%	100%	20%	-	40%	-	-	-
4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	-	-	80%	100%	60%	100%	100%	100%
Mediana	3	3	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]	4 [†]

Análise inter-grupo: *Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS aos 28 dias. [†]Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS aos 14 e 28 dias. Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$) em todos os testes.

Tabela 3: Médias e desvio padrões (M±DP) da porcentagem de osso na furca (POF) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.

Grupos		
Grupos	14 Dias	28 Dias
A		
SPE-SS/SS	83.74 ± 3.26	84.34 ± 1.91
SPE-SS/ZOL	86.82 ± 1.90	93.37 ± 1.37*†‡
SPE-CIS/SS	84.66 ± 2.02	86.74 ± 1.67
SPE-CIS/ZOL	84.53 ± 1.71	89.64 ± 1.68 *†‡
B		
PE-SS/SS	68.07 ± 8.34	60.61 ± 5.62
PE-SS/ZOL	79.06 ± 3.1*	78.30 ± 1.80*
PE-CIS/SS	65.48 ± 4.84	50.92 ± 4.12†
PE-CIS/ZOL	78.77 ± 1.85*	81.04 ± 7.09*

A

Comparação inter-grupo:

* Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS/SS e SPE-CIS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa com SPE-SS/ZOL no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Comparação intra-grupo:

‡ Diferença estatisticamente significativa com 14 dias no mesmo grupo. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

B

Comparação inter-grupo:

* Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS e PE-CIS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 4: Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) da porcentagem de osso necrosado (PON) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.

Grupos		
Grupos	14 Dias	28 Dias
SPE-SS/SS	0.80 ± 0.29	0.78 ± 0.19
SPE-SS/ZOL	$8.92 \pm 0.92^{*\dagger}$	$11.42 \pm 1.90^{*\dagger}$
SPE-CIS/SS	$5.26 \pm 0.68^*$	$6.30 \pm 0.31^*$
SPE-CIS/ZOL	$13.27 \pm 1.74^{*\dagger\ddagger}$	$16.29 \pm 1.16^{*\dagger\ddagger}$
PE-SS/SS	2.00 ± 0.47	2.38 ± 0.40
PE-SS/ZOL	$15.68 \pm 2.20^{*\dagger}$	$29.58 \pm 3.26^{*\dagger}$
PE-CIS/SS	$9.24 \pm 1.41^*$	$13.44 \pm 1.12^*$
PE-CIS/ZOL	$40.36 \pm 5.19^{*\dagger\ddagger}$	$45.40 \pm 7.51^{*\dagger\ddagger}$

* Diferença estatisticamente significante com PE-SS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significante com PE-CIS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

‡ Diferença estatisticamente significante com PE-SS/ZOL no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 5: Médias e desvio padrões ($M \pm DP$) das células TRAP-positivas na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período.

Grupos		
Grupos	14 Dias	28 Dias
SPE-SS/SS	13.2 ± 2.13	13.6 ± 1.01
SPE-SS/ZOL	18.4 ± 3.13	15.2 ± 2.99
SPE-CIS/SS	19.0 ± 3.00	18.4 ± 2.72
SPE-CIS-ZOL	20.33 ± 4.18	18.5 ± 3.5
PE-SS/SS	41.75 ± 1.25	43.2 ± 3.31
PE-SS/ZOL	$35.16 \pm 3.12^*$	$34.50 \pm 3.13^*$
PE-CIS/SS	$49.40 \pm 2.49^{*\dagger}$	40.66 ± 5.90
PE-CIS/ZOL	$56.80 \pm 3.12^{*\dagger\ddagger}$	$49.8 \pm 3.18 \dagger\ddagger$

Comparação inter-grupo:

* Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa com PE-SS/ZOL no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

‡ Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS/SS no mesmo período. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 1

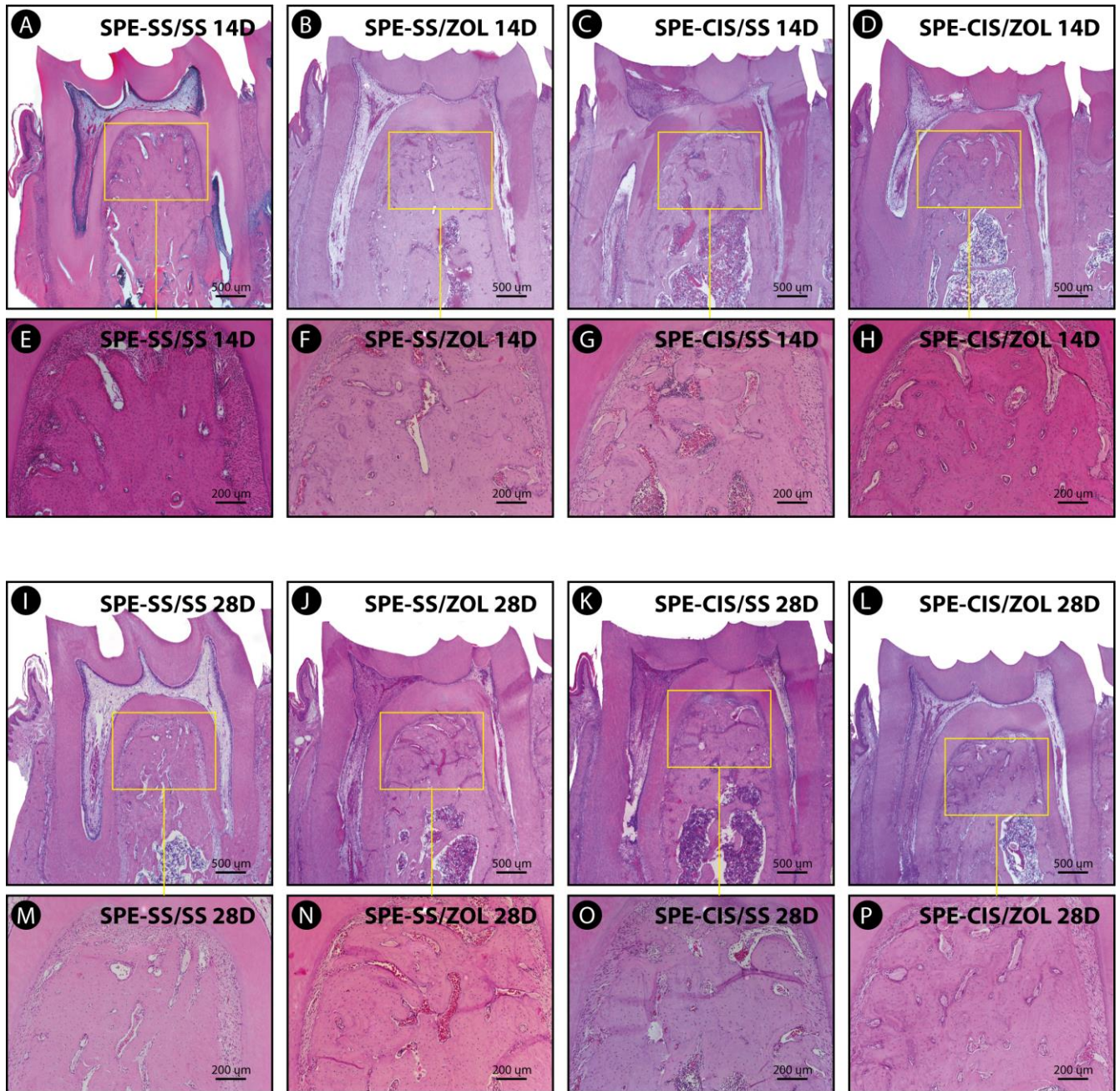


Figura 1: Fotomicrografias evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de ratos sem periodontite experimental nos períodos de 14 e 28 dias (A-P). SPE-SS/ZOL e SPE-CIS/ZOL apresentaram diminuição do espaço do ligamento periodontal aos 28 dias (J, L, N e P). $\text{SPE-SS/SS} < \text{SPE-CIS/SS} < \text{SPE-SS/ZOL} < \text{SPE-CIS/ZOL}$ em relação a diferença de PON (osteócitos). (A-P). Abreviações: CIS: Cisplatina; D: dias; μm : micrometros; PE: periodontite experimental; SPE: sem periodontite experimental; SS: solução salina; ZOL: zoledronato. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 μm .

Figura 2

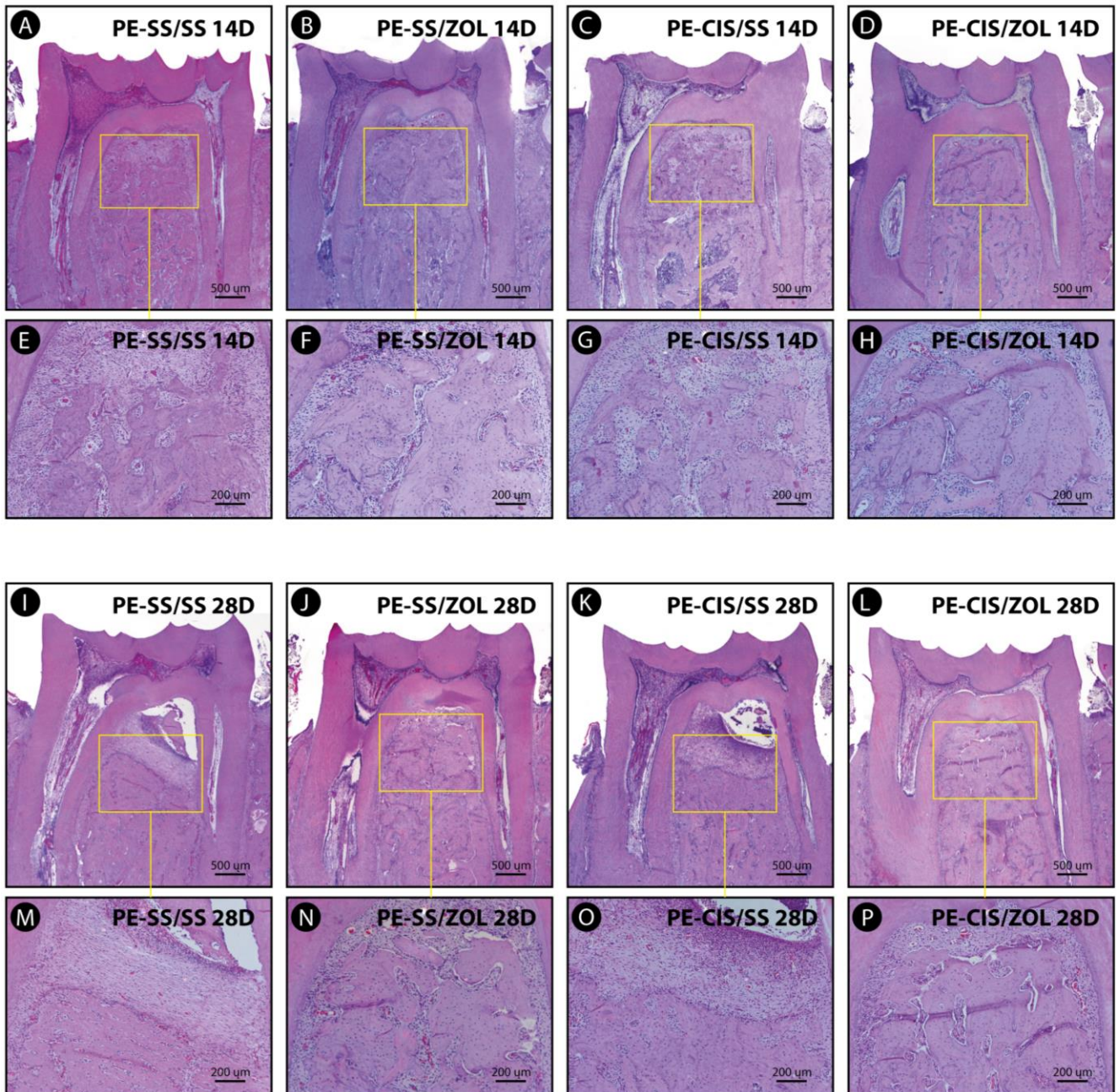


Figura 2: Fotomicrografias evidenciando as características histopatológicas da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de ratos com periodontite experimental nos períodos de 14 e 28 dias (A-P). Pequena perda óssea em PE-SS/ZOL e PE-CIS/ZOL (B, F, J, N, D, H, L e P). PE-SS/SS < PE-CIS/SS < PE-SS/ZOL < PE-CIS/ZOL em relação a diferença de PON (osteócitos) entre os grupos. Abreviações: CIS: Cisplatina; D: dias; µm: micrometros; PE: periodontite experimental; SS: solução salina; ZOL: zoledronato. Coloração: hematoxilina e eosina (H.E). Barras de escala: 500 µm.

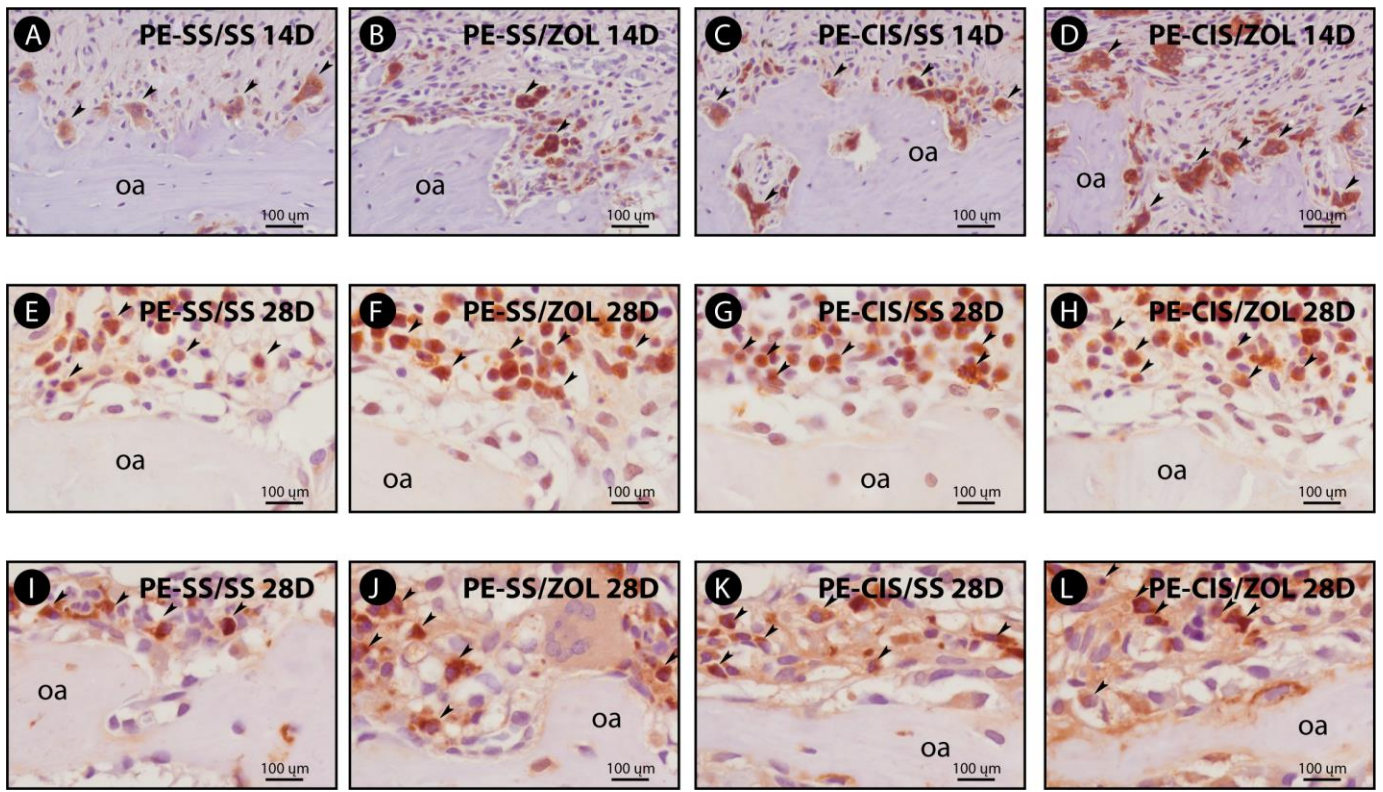
Figura 3

Figura 3: Fotomicrografias evidenciando a quantidade de células TRAP-positivas (A-D) e o padrão de imunomarcção para TNF- α (E-H), IL-1 β (I-K) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental (PE) induzida nos períodos de 14 dias (TRAP) e 28 dias (TNF- α e IL-1 β). Abreviações: CIS: Cisplatina; D: dias; μ m: micrometros; oa: osso alveolar; PE: periodontite experimental; SPE: sem periodontite experimental; SS: solução salina; ZOL: zoledronato. Setas: células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras de escala 100 μ m.

Figura 4

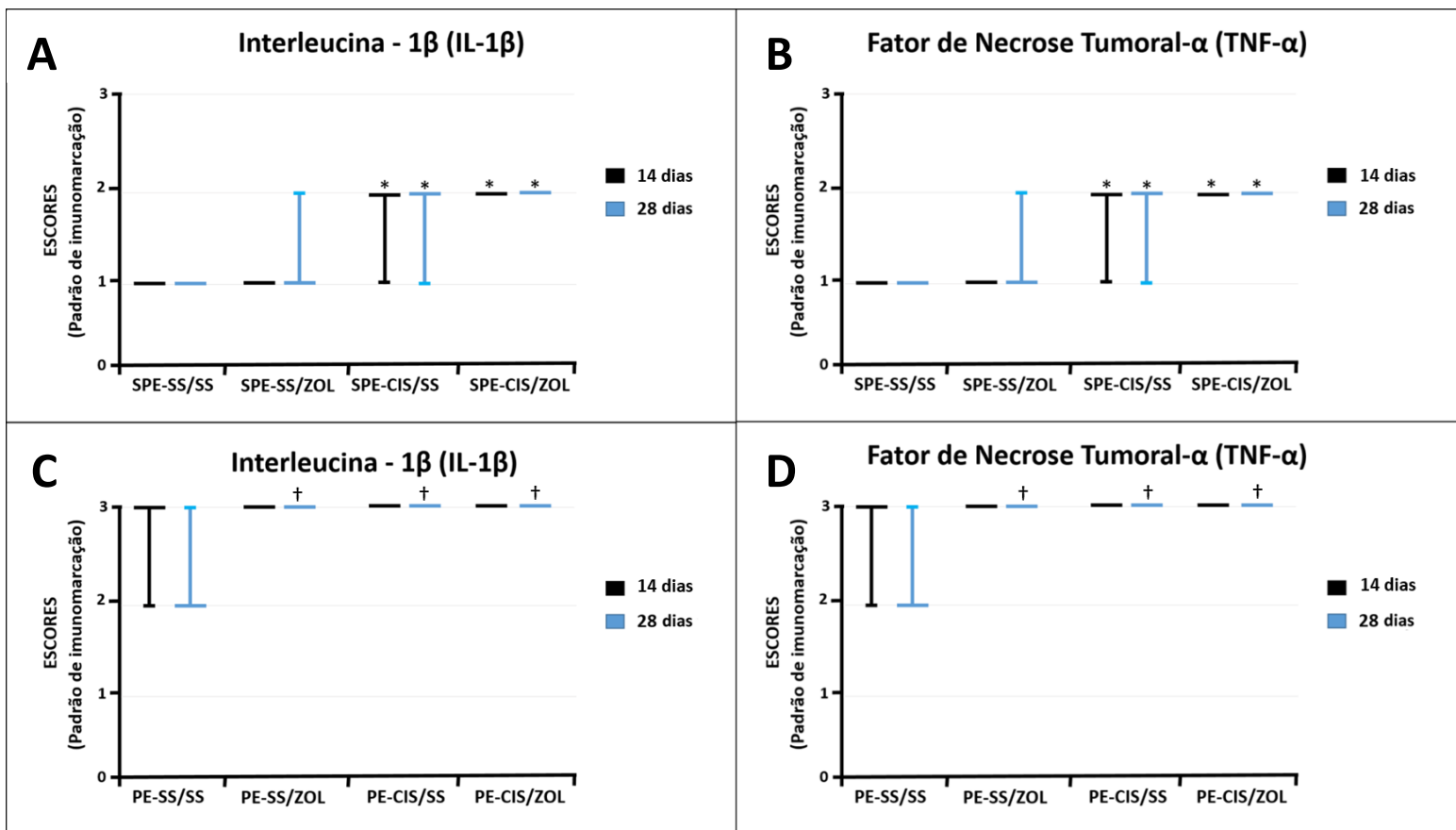


Figura 4: Gráficos mostrando a mediana e o desvio interquartilho para os escores de IL-1 β (A, C) e TNF- α (A, C) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de acordo com cada grupo e período nos animais sem doença periodontal induzida (A, B) e com doença periodontal induzida (C e D). Símbolos: *diferença estatisticamente significativa com SPE-SS/SS e SPE-SS/ZOL aos 14 e 28 dias; † diferença estatisticamente significativa com PE-SS/SS aos 28 dias. . Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p \leq 0,05$) em todos os testes.

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Resposta imunoinflamatória na periodontite experimental induzida em ratos submetidos à dose oncológica de zoledronato e a quimioterapia"**, Processo FOA nº 00608-2017, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 16 de Agosto de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 09 de Abril de 2020.

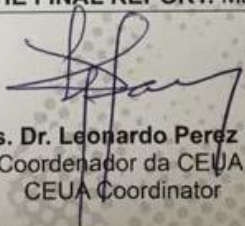
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 09 de Maio de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Immunoinflammatory response in induced experimental periodontitis in rats submitted to an oncologic dose of zoledronate and chemotherapy"**, Protocol FOA nº 00608-2017, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 16, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 09, 2020.

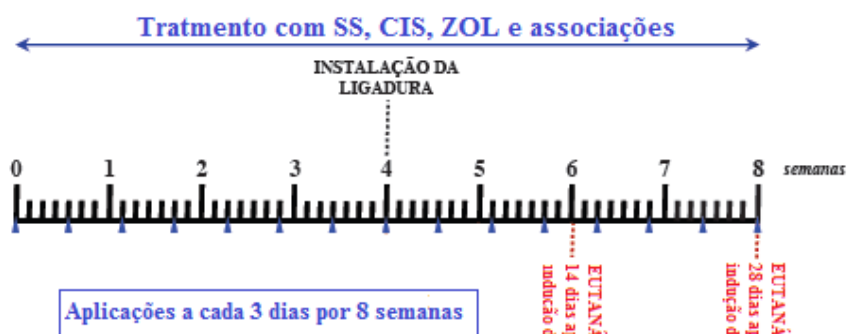
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 09, 2020.



Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

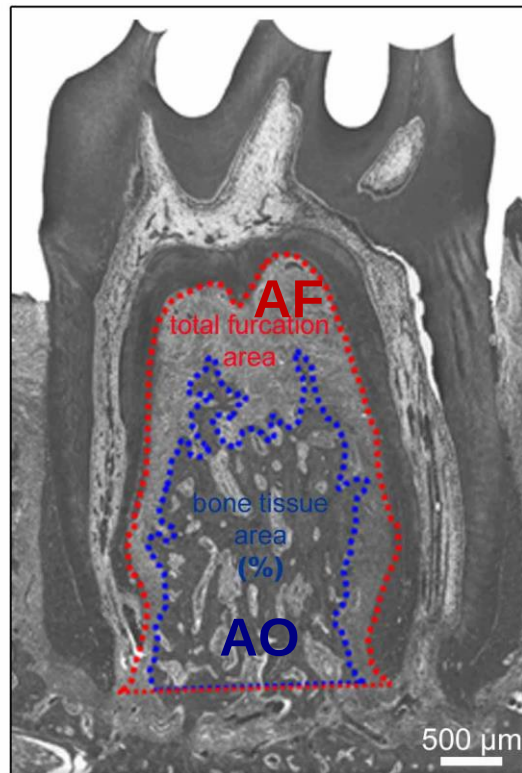
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo B – Delineamento do Estudo

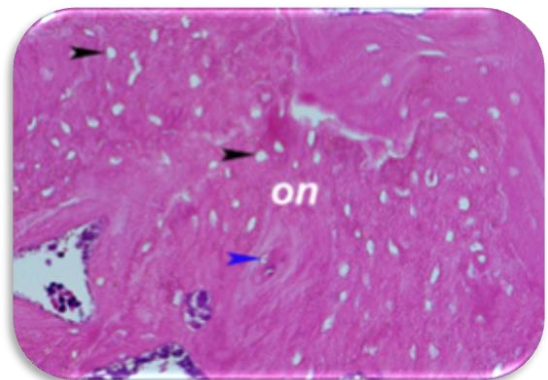
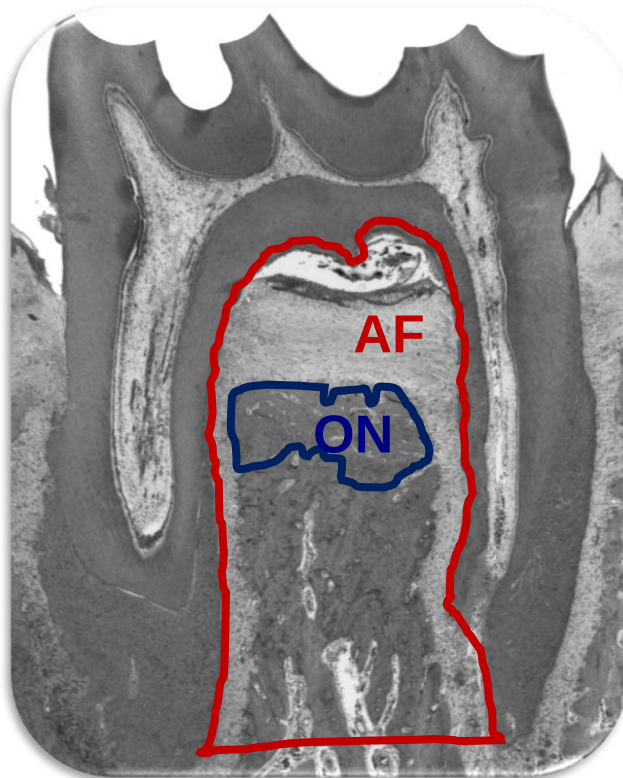


Anexo B: Esquema mostrando os procedimentos experimentais em seus respectivos intervalos de tempo nos grupos tratados com SS, CIS, ZOL e suas associações. Abreviações: SS: solução salina; CIS: Cisplatina; ZOL: Zoledronato.

Anexo C – Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica POF.



$$\text{POF} = (\text{AO} \times 100) / \text{AF}$$

Anexo D – Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica PON

Área considerada necrosada com
ausência de osteócito

$$\text{PON} = (\text{ON} \times 100) / \text{AF}$$

Anexo E - Normas para Publicação segundo o Periódico - Journal of Periodontology

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Relevant Document: [Sample Manuscript](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Clinical Periodontology](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.



1. GENERAL

Journal of Clinical Periodontology publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Clinical Periodontology*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell's Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Clinical Periodontology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Journal of Clinical Periodontology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting

the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Please note that it is a requirement to include email addresses for all co-authors at submission. If any of the email-addresses supplied are incorrect the corresponding author will be contacted by the journal administrator.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org.

A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

Journal of Clinical Periodontology encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Journal of Oral Rehabilitation requires that all authors (both the corresponding author and co-authors) disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, please contact the editorial office at cpeedoffice@wiley.com. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

[Conflict of Interest Disclosure Form](#)

2.6 Appeal of Decision

Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at cpeedoffice@wiley.com with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

Please note that all revisions and resubmissions of papers should also include a separate rebuttal and a tracked changes document to assist in peer review.

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available on the submission site. Further assistance can be obtained from the Senior Editorial Office Assistant, Kim Harris, at cpeedoffice@wiley.com.

Please note that all revisions and resubmissions of papers should also include a separate rebuttal and a tracked changes document to assist in peer review.

3.1. Manuscript Files Accepted

Main manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected). The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends,

but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc. to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded.

Figure files should be uploaded separately to the main text. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing.

Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

Please ensure that ALL items (figures and tables) are cited in the main text.

3.2. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Clinical Periodontology* will be reviewed by two or more experts in the field. Papers that do not conform to the general aims and scope of the journal will, however, be returned immediately without review. *Journal of Clinical Periodontology* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.3. Suggest a Reviewer

Journal of Clinical Periodontology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the name and current email address of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the editor will choose one or two reviewers as well.

3.4. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.5. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.6 Resubmissions

If your manuscript was given the decision of reject and resubmit, you might choose to submit an amended version of your manuscript. This should be submitted as a new submission following the guidelines above under 3.2. In addition you should upload comments to the previous review as "supplementary files for review".

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Journal of Clinical Periodontology publishes **original research articles**, **reviews**, **clinical innovation reports** and **case reports**. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research.

Original Research Articles must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles

will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

Clinical Innovation Reports are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. Please refer to English Language Editing Services offered by Wiley at <http://wileyeditingservices.com/en/>.

Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors.

Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.2. Structure

All articles submitted to Journal of Clinical Periodontology should include:

- Title Page
- Conflict of Interest and Source of Funding
- Clinical Relevance
- Abstract
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- References
- Tables (where appropriate)
- Figure Legends (where appropriate)

- Figures (where appropriate and uploaded as separate files)

All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

Title Page: The title must be concise and contain no more than 100 characters including spaces. The title page should include a running title of no more than 40 characters; 5-10 key words, complete names of institutions for each author, and the name, address, telephone number, fax number and e-mail address for the corresponding author.

Conflict of Interest and Source of Funding: Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Source of Funding Statement".

See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding](#) and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

Abstract: is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper.

For Original Research Articles the abstract should be organized with **aim, materials and methods, results and conclusions**.

For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

Clinical Relevance: This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice. It should be structured with the following headings: **scientific rationale for study, principal findings, and practical implications**.

Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

5.3. Original Research Articles

These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

The word limit for original research articles is 3500 words, and up to 7 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

Main Text of **Original Research Articles** should be organized with

- Introduction,
- Materials and Methods,
- Results and Discussion.
- References (Harvard, see section 5.7)

The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

(a) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A **CONSORT checklist** should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

Journal of Clinical Periodontology encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(b) Statistical Analysis: As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

(c) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(d) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by [Richard Horton \(2002\), The Hidden Research Paper, The Journal of the American Medical Association, 287, 2775-2778](#)). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in mind.

Summary of key finding

- * Primary outcome measure(s)
- * Secondary outcome measure(s)
- * Results as they relate to a prior hypothesis

Strengths and Limitations of the Study

- * Study Question
- * Study Design
- * Data Collection
- * Analysis
- * Interpretation
- * Possible effects of bias on outcomes

Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

- * Is there a systematic review to refer to?
- * If not, could one be reasonably done here and now?

- * What this study adds to the available evidence
- * Effects on patient care and health policy
- * Possible mechanisms

Controversies Raised by This Study Future Research Directions

- * For this particular research collaboration
- * Underlying mechanisms
- * Clinical research

5.4. Clinical Innovation Reports

These are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

The word limit for clinical innovation reports is 3000 words, and up to 12 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

The main text of Clinical Innovation Reports should be organized with

- Introduction,
- Clinical Innovation Report,
- Discussion and Conclusion
- References (Harvard, see section 5.7)

5.5. Case Reports

Case reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

The main text of Case Reports should be organized with

- Introduction,
- Case report,
- Discussion and Conclusion
- References (see section 5.7)

5.6. Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

The word limit for reviews is 4000 words.

The main text of Reviews should be organized with

- Introduction,
- Review of Current Literature,
- Discussion and Conclusion
- References (Harvard, see section 5.7)

5.7. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

Reference style (Harvard):

References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966.

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

- a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.
- b) The order of the items in each reference should be:
 - (i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.
 - (ii) for book references: name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher.
- c) Authors' names should be arranged thus: Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Authors' names when repeated in the next reference are always spelled out in full.
- d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967).
- e) The title of the paper should be included without quotation marks.
- f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers.

Examples: Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* **10**, 820-828. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00565.x

Lindhe, J., Lang, N.P. & Karring, K. (2003) *Periodontology and Implant Dentistry*. 4th edition, p. 1014, Oxford. Blackwell Munksgaard.

Bodansky, O. (1960) Enzymes in tumour growth with special reference to serum enzymes in cancer. In *Enzymes in Health and Disease*, eds. Greenberg, D. & Harper, H. A., pp. 269-278. Springfield: Thomas.

URL: Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Example: Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document].

URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November 2003]

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

5.8. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Each copy should be marked with the figure number and the corresponding author's name. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size. Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans

(TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Detailed information on our digital illustration standards can be found

at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Guidelines for Cover Submission

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, [please follow these guidelines](#).

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

Figure Legends: should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

5.9. Supplementary Material

Supplementary material, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition, can be uploaded as 'Supporting information for review and online publication only'.

Please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp> for further information on the submission of Supplementary Materials.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

The Journal of Clinical Periodontology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Production Tracking

Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with [Wiley-Blackwell's Author Services](#).

6.4 Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Given that copyright licensing is a condition of publication, a completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format.

7. OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

8. Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer

agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions: http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant selfarchiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.