



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA k
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CLARA POSSARLE CUNHA

"Influência da quimioterapia na expressão de citocinas pró-inflamatórias tecidual na periodontite experimental."

ARAÇATUBA-SP
2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CLARA POSSARLE CUNHA

“Influência da quimioterapia na expressão de citocinas pró-inflamatórias tecidual na periodontite experimental.”

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Juliano Milanezi de Almeida.

ARAÇATUBA-SP
2018

Á minha mãe, Maria Silvia, meu porto seguro, que batalhou todos os dias e abriu mão de vários sonhos para que o meu se tornasse realidade.

Ao meu pai, Sérgio Paulo, exemplo de profissional e ser humano, por todos os ensinamentos passados para que eu conseguisse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço à **Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.*

*À disciplina de **Periodontia** e ao departamento de **Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP**, Araçatuba, São Paulo, Brasil.*

*À **Banca Examinadora**, Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, Prof. Dr. Edilson Ervolino, e o Doutorando David Jonathan Rodrigues Gusman, pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho, contribuindo para minha formação.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo 2015/21332-7).*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico – CNPQ**, pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo 31107).*

A todos os professores, técnicos, assistentes e amigos que influenciaram de maneira direta na minha trajetória e contribuíram de forma inestimável para minha formação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a todos que ao longo desses anos estiveram comigo nesta caminhada, me apoiando, incentivando e desejando o meu melhor.

*Aos meus pais **Sérgio Paulo e Maria Silvia**, pelo dom da vida, por me educarem para escolher o caminho do bem, da honestidade e do amor.*

*Aos meus irmãos **Mariana e Rômulo**, por serem meus companheiros nessa vida e apoiarem sempre meus sonhos e minhas escolhas.*

*À minha avó **Maria de Lourdes**, por estar presente em todos os momentos da minha vida, minha eterna companheira e meu porto seguro. A minha avó **Cynira**, com quem convivi por 15 anos da minha vida, mulher íntegra com valores e princípios únicos. E também aos meus avós **Clementino e José da Cunha**, aos quais não tive a oportunidade de conhecer, mas sempre se fizeram presente.*

*À toda **minha família**, por todas as orações, toda palavra de força e motivação para que eu conseguisse chegar até aqui.*

*Ao **Vitor**, por ser essa pessoa incrível, por compartilhar comigo essa linha de frente que é a vida; também, por me presentear com uma família tão especial, que faz toda diferença na minha história, **Débora, Norberto, Natália e Betina**.*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, pela oportunidade de participar de um projeto de pesquisa, e me apresentar à vida científica. Pela sua dedicação, paciência, cuidado e ajuda em todos os momentos, sempre nos acolhendo e mostrando que é possível ser além de um excelente profissional, uma pessoa excepcional. Deixo aqui minha admiração e gratidão por tudo que me proporcionou durante este tempo que trabalhamos juntos.*

*Ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, pela oportunidade que me deu de iniciar na vida científica. Sou muito grata pela confiança que depositou em mim quando ainda estava no primeiro ano da faculdade. Admiro seu empenho e competência no que faz, nos mostrando que sempre devemos ter amor e dedicação naquilo que fazemos, que o sucesso, o reconhecimento, é apenas uma consequência.*

*À eterna chefe **Dra. Vivian Cristina Noronha Novaes** mulher competente e admirada, por todo conhecimento passado, toda dedicação conosco, nunca medindo esforços para nos ajudar. Foi um imenso prazer desenvolver esse trabalho com você e poder acompanhar toda sua jornada do doutorado de perto, dias de muito*

trabalho, mas sempre com muita alegria e leveza. Sem dúvidas uma inspiração como mulher, mãe e profissional.

*À professora **Flávia Furlaneto**, por nos abrir as portas para a vida científica, e por toda experiência passada no pouco tempo que convivemos.*

*Ao meu fiel escudeiro **Giovani**, não cabem palavras para mensurar a importância da sua presença nessa etapa da minha vida. “Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha.” Essa frase retrata as incontáveis vezes que fomos a pé até a FOA – centro, e também ao caminho que percorremos durante toda a faculdade, o qual parecia eterno.*

*Ao **Henrique**, por ser essa pessoa ímpar, a dedicação e o amor que tem no que faz, é admirável. Golden Boy, tem reservado um futuro brilhante.*

*Aos colegas da pós-graduação, **David, Breno, Natália, Fiorin**, pela disponibilidade de sempre e por toda ajuda na realização desse trabalho.*

*À minha querida e formosa **Kombi - Juliana, Ricardo, Fernanda, Giovani** -, obrigada pelo aprendizado diário que tive com vocês nesses 6 anos de faculdade, nem todo dia é um dia bom, mas independentemente da situação, sempre estivemos um ao lado do outro, compartilhando dificuldades, conquistas, histórias, provas e pacientes. Aprendi com vocês o valor do respeito, da cumplicidade e do companheirismo.*

*Às minhas irmãs do coração, **Fernanda Yogui e Natália Bachiega**, por me ensinarem que família nem sempre precisa ser de sangue, por serem anjos que cuidaram de mim durante toda a faculdade, por serem colo quando a saudade de casa batia, por serem cuidado, atenção e amor, vocês são excepcionais na minha vida. À **Carol**, por poder compartilhar esse último ano de faculdade comigo, por todos os momentos bons que passamos morando juntas. À **Danila, Mariana e Larissa**, por todo aprendizado que me proporcionaram no tempo em que moramos juntas.*

*Aos amigos que estiveram comigo na 8º Missão Univida, **Ana Daniela Spínola, Bruna Dias, Cássio Figueiredo, Diego Mardegan, Giovani Fernandes, Gleice Ramirez, Igor Zen, Jaqueline Barboza, Jéssica Paiva, Letícia Chaves, Lia Kobayashi, Mayara Rodrigues, Paulo Augusto, Roberta Kanda, Verônica Mantovani, Wesley Telles e ao Professor Leonardo Faverani**, passamos juntos por uma experiência que mudou nossas vidas, obrigada por fazerem a diferença, cada um de vocês foi essencial, vocês são inesquecíveis. Agradeço ao Diretor e Professor*

Wilson Poi e ao **Pe. Eduardo Lima** por nos proporcionarem esta oportunidade.

Às minhas amigas maravilhosas, **Laís Tarloto, Nathália Bertoto, Fiama Rapette, Fábíola Campos, Amanda Arruda, Mayra Garcia, Ana Carolina Gomes**, com quem eu tenho o prazer de compartilhar a vida desde sempre, por todo apoio e incentivo, por acreditarem em mim quando eu mesma não acredito, vocês são essenciais.

À minha amada **Turma XV**, tínhamos um objetivo em comum, nos tornarmos cirurgiões dentistas, e hoje, estamos realizando esse sonho juntos. Sou muito grata em poder compartilhar esse momento tão especial com cada um de vocês, foram 6 anos inesquecíveis.

*“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.” **John Ruskin***

CUNHA, CP. **Influência da quimioterapia na expressão de citocinas pró-inflamatórias tecidual na periodontite experimental** 2018. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou comparativamente a influência do quimioterápico Cisplatina (CIS), no periodonto saudável e sobre a evolução da periodontite experimental (PE), bem como a função renal de ratos portadores de PE submetidos ao tratamento com o quimioterápico. **Materiais e Métodos:** 120 ratos machos, foram distribuídos em 4 grupos (n=30). Grupo SPE-SS: animais que receberam injeções de 0,5 ml de solução salina 0,9% (SS) sem indução da PE (grupo *sham*). Grupo PE-SS: animais que receberam duas injeções de 0,5 ml de SS e indução da PE após a primeira injeção. Grupo SPE-CIS: Animais que receberam injeções de CIS sem indução da PE. Grupo PE-CIS: Animais que receberam injeções de CIS e indução da PE após a primeira injeção. Para indução da PE foi adaptado um fio de algodão 24 ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, logo após a primeira dose da medicação. Decorridos 07, 15 e 30 dias após a primeira injeção intraperitoneal (SS ou CIS) os animais foram eutanasiados. As mandíbulas coletadas foram submetidas à análise imunoistoquímica na região de furca do primeiro molar inferior onde foram avaliados os biomarcadores: TNF α e IL1 β . Foi realizada a coleta sanguínea para análise bioquímica de Creatinina e Ureia previamente às injeções, e aos 7 e 30 dias. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística ($p < 0,05$). **Resultados:** Observou que o grupo PE-CIS apresentou maior intensidade da resposta inflamatória em todos os períodos e menor processo de reparo frente a PE. O grupo PE-CIS apresentou de maneira significativa maiores níveis de ureia nos períodos iniciais e não apresentou diferença significativa nos níveis de creatinina. **Conclusão:** A CIS influenciou o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos periodontais saudáveis, além de, na presença da PE, ter exacerbado o processo inflamatório na região de furca. Adicionalmente, a PE aumentou os níveis séricos de ureia, indicando um agravamento aos danos renais causados pela CIS em períodos iniciais.

Palavras Chave: Periodontite experimental; Quimioterapia; Modelo animal.

CUNHA, CP. **Influence of chemotherapy on expression of pro inflammatory cytokines tissue in experimental periodontitis** 2018. End of course paper (Bachelor degree) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2018

ABSTRACT

Objective: This study comparatively evaluated the influence of the chemotherapeutic agent Cisplatin (CIS), both over the healthy periodontium and the progression of experimental periodontitis (EP), as well as kidney functions of the rats with EP under chemotherapy. **Materials and Methods:** 120 male rats were distributed in 4 groups (n=30). NEP-SS group: animals that received injections of 0,5ml of 0,9% saline solution (SS) without EP induction (*Sham* group). EP-SS group: animals that received injections of 0,5 ml of SS and induction of EP after de first injection. NEP-CIS group: animals that received CIS injections without EP induction. EP-CIS group: animals that received CIS injections and PE induction after the first injection. For EP induction a cotton thread number 24 was fitted around the first left lower first molar. After 07, 15 and 30 days after the first intraperitoneal injection (SS or CIS), animals were euthanized. The collected mandibles were submitted to immunohistochemical analysis in the furcation region of the first lower molar for evaluation of the biomarkers TNF α and IL1 β . Blood samples were collected for biochemical analyzes of creatinine and urea, before injections and at 07 and 30 days. Data were submitted to statistical analysis ($p < 0,05$). **Results:** EP-CIS showed greater intensity and extension of the inflammatory response, and decreased repair process compared with group EP at all experimental periods. EP-CIS had significantly increased levels of urea and showed no significant difference in creatinine' levels. **Conclusion:** CIS influenced the increased expression of proinflammatory cytokines in healthy periodontal tissues, as well ass, in presence of EP, exacerbated the inflammatory process in the furcation region. Additionally, EP increased serum levels of urea, indicating an intensification of the renal damages caused by CIS.

Keywords: Experimental Periodontitis; Chemotherapy; Animal model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimentos de indução da periodontite.

Figura 2. Administração do Quimioterápico.

Figura 3. Cortes histológicos.

Figura 4. Procedimentos da análise bioquímica.

Figura 5. Padrão de imunomarcação para TNF α na região de furca do primeiro molar inferior após 30 dias da indução da PE.

Figura 6. Padrão de imunomarcação para IL-1 β na região de furca do primeiro molar inferior após 30 dias da indução da PE.

Figura 7. Gráfico mostrando os níveis de Creatinina em cada grupo no decorrer dos períodos.

Figura 8. Gráfico mostrando os níveis de Ureia em cada grupo no decorrer dos períodos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrão de imunomarcacão de células imunorreativas à TNF α na região de furca do primeiro molar, para cada grupo e período.

Tabela 2. Padrão de imunomarcacão de células imunorreativas à IL-1 β na região de furca do primeiro molar, para cada grupo e período.

LISTA DE ABREVIATURAS

µm- micrômetro, equivalente à milésima parte do milímetro

5-FU – 5 Fluorouracil

ANOVA – Análise de Variância

CIS – Cisplatina

DNA - Ácido desoxiribonucleico

DP - Doença Periodontal

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

EP - Experimental periodontitis

g – Grama

IL – Interleucina

mg/Kg - Miligramas por quilogramas

mL - Mililitros, equivalente à milésima parte do litro

MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos-1

MIP-2 - Proteína inflamatória de macrófagos-2

NEP- No experimental periodontitis

PE – Periodontite experimental.

PG- Porphyromonas gingivalis

RANKL - Receptor ativador de NF-Kappa B ligante

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular

RNA - Ácido ribonucleico mensageiro

SPE – Sem Periodontite Experimental

SS – Solução Salina.

TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Objetivo.....	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1 Animais	19
3.2 Sedação Medicamentosa	19
3.3 Indução da periodontite	19
3.4 Protocolo medicamentoso – tratamento quimioterápico.....	20
3.5 Grupos experimentais e tratamentos	21
3.6 Períodos experimentais e obtenção das amostras.....	21
3.7 Linha do tempo	21
3.8 Processamentos histológicos.....	22
3.9 Análise imunoistoquímica.....	22
3.10 Análise bioquímica do sangue	23
3.11 Análise estatística	23
4. Resultados	24
4.1 Resultados da análise imunoistoquímica.....	24
4.2 Resultados da análise bioquímica do sangue.....	26
5. Discussão	28
6. Conclusão	31
REFERENCIAS	32
ANEXOS	39

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida do paciente oncológico é realidade graças às novas terapias de combate ao câncer. Com isso, proporcionar qualidade de vida a esses pacientes se tornou uma busca constante. A OMS estima que o aparecimento anual de novos casos de câncer irá aumentar dos 14 milhões para 22 milhões dentro das próximas duas décadas (WHO 2014).

A quimioterapia citotóxica está entre os tratamentos convencionais para o câncer, e junto com ela estão outras duas modalidades importantes, cirurgia e radioterapia. A maioria dos casos de quimioterapia para o tratamento do câncer se baseia na administração de uma dose máxima tolerável das drogas escolhidas, com o objetivo de promover a erradicação do maior número de células tumorais. O principal problema desse método está relacionado com a toxicidade aguda e acumulado para os tecidos normais, incluindo as células do sistema imune. A quimioterapia convencional está comumente associada com uma variedade de efeitos colaterais, inclusive mielossupressão e diminuição da viabilidade e número de células dendríticas (Saltz & Kemeny, 1996; Half & Arber, 2009). Além do mais, náusea, alopecia, anorexia, vômitos, diarreia, constipação, zumbido e hipocalcemia, são geralmente, sintomas associados ao uso desses medicamentos (Surendiran et al., 2010).

Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, a cisplatina (CIS) é uma droga amplamente utilizada durante a quimioterapia (Vermorken et al., 2014; Lorch et al., 2011; Taylor et al., 1994), e também no decorrer da radioterapia em razão do seu potencial radiosensibilizador (Dewit, 1987). A CIS é um composto com ampla atividade antineoplásica, sendo utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, dentre os quais, testículo, pulmão, ovário, esôfago, cabeça e pescoço, mama e o carcinoma de bexiga (Wang & Lippard, 2005; Pang et al., 2007; Zhang et al., 2009).

A molécula de CIS possui um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia. Torna-se ativa pela reação de moléculas de água com os íons cloreto, reagindo, assim, com biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (Wang & Lippard, 2005; Cho et al., 2008). Sabe-se que a atividade antitumoral da CIS é resultado da sua interação com o DNA. Esta, ao entrar na célula, sofre reações que deixam a platina disponível para se ligar a bases do DNA e formar vários tipos de aductos que podem dar origem a ligações cruzadas

intra e intercadeia (Wozniak et al., 2004; Wang & Lippard, 2005; Rabik & Dolan, 2007). As alterações mais frequentemente observadas no DNA são os aductos entre guaninas adjacentes, que representam cerca de 65% de todas as lesões; 25% são representadas por aductos entre guanina e adenina e o restante é formado por ligações cruzadas intercadeias (Kartalou & Essigmann, 2001; Rabik & Dolan, 2007; Koberle et al., 2010). Os aductos cisplatina-DNA podem inibir processos celulares fundamentais que incluem replicação, transcrição, tradução e reparo de DNA (Wozniak et al., 2004; Cho et al., 2008).

Os quimioterápicos antineoplásicos atuam no metabolismo das células que possuem rápido crescimento e proliferação, como as células cancerígenas, induzindo sua apoptose (Guchelaar et al., 1998; Arias, 2008). A falta de especificidade na sua biodistribuição sistêmica faz com que estas drogas atinjam tanto as células alvo como as células saudáveis que possuem alto índice mitótico (Arias, 2008), que é o caso do epitélio oral, por razão da sua rápida renovação, faz com que a cavidade bucal apresente efeitos adversos acentuados (Naidu et al., 2004). São comumente observadas mucosite e hipofunção das glândulas salivares, sendo estas as manifestações adversas às quais interferem significativamente na qualidade de vida do indivíduo (Kim et al., 2012).

No periodonto, o epitélio juncional é responsável pela adesão dentogengival e tem um papel fundamental na defesa do tecido periodontal (Tsukamoto et al., 2012). Por ser um tecido com rápida proliferação ele pode ter sua renovação comprometida pela ação dos quimioterápicos, o que pode favorecer a penetração e contaminação dos tecidos mais profundos, incluindo os que compõem o periodonto de sustentação. Por outro lado, a CIS promove um efeito negativo sobre o processo de reparação óssea em defeitos ósseos (Stine et al., 2014). Desta forma, estas alterações podem favorecer o desenvolvimento da doença periodontal (DP).

A DP é uma patologia multifatorial que afeta de 30% a 50% da população adulta, caracteriza-se por ser um processo infeccioso e inflamatório que leva a destruição dos tecidos de suporte dos dentes. É causada por microrganismos periodontopatogênicos e possui influência de fatores locais e sistêmicos, que alteram a resposta do indivíduo frente à agressão microbiana (Andersen et al., 2007; Cekici et al., 2014).

Estudos em animais que avaliaram a influência do efeito da CIS no processo de reparo ósseo concluíram que a quimioterapia com CIS afetou

negativamente o reparo ósseo (Barth et al., 1986; Ehrhart et al., 2002) e provocou atraso no reparo (Young et al., 1997; Stine et al., 2014). Além do mais, a CIS tem a capacidade de induzir citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-1 β (IL-1- β), IL-6, IL-8, IL-18, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) (Miller et al., 2010; Ozkok & Edelstein, 2014). Sabe-se que a resposta destrutiva do organismo está associada com um aumento da expressão de citocinas inflamatórias nos tecidos, e as IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α podem induzir a reabsorção óssea periodontal (Dosseva-Panova et al., 2014).

Por outro lado, estudos em animais que avaliem a influências de drogas utilizadas na quimioterapia sobre os tecidos periodontais são raros, havendo apenas um estudo (Garcia et al., 2015). Garcia et al.,(2015), utilizando modelo em animais de periodontite experimental, teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento com 5-FU administrado sistemicamente no momento da indução da doença periodontal experimental e 48 horas após indução (60 mg/kg e 40 mg/kg), sobre o periodonto saudável, assim como a influência deste tratamento sobre os tecidos periodontais durante a evolução da periodontite experimental ou após tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular. Os autores observaram que nos animais que receberam tratamento sistêmico com 5-FU apresentaram menor porcentagem de osso na furca, maior infiltrado inflamatório e maior padrão de imunomarcagem para RANKL. Foi demonstrado neste estudo que a administração de 5-FU influenciou na evolução e no tratamento da doença periodontal experimental em ratos. Desta forma, é de suma importância o entendimento da influência dos quimioterápicos sobre a patogênese da DP para que possa entender seu potencial modificador na etiologia e desenvolvimento da mesma.

Com relação aos estudos clínicos, poucos estudos avaliaram os efeitos adversos dos quimioterápicos antineoplásicos nos tecidos periodontais (Miller & Quinn, 2006; Mazzeo et al., 2009; Djuric et al., 2010; Ogawa et al., 2013). Estes estudos demonstraram que a quimioterapia provocou aumento do índice gengival (Jensen et al., 2008; Djuric et al., 2010), placa e sangramento a sondagem (Djuric et al., 2010). Além disso, é visto a alteração na resposta inflamatória gengival e aumento na profundidade de sondagem nesses pacientes (Mazzeo et al., 2009; Djuric et al., 2010). Ogawa et al., (2013) constataram que a periodontite ocorreu com maior frequência em pacientes que receberam tratamento quimioterápico, e Miller & Quinn, (2006)

constatarem que a quimioterapia causa exacerbação da doença periodontal. Porém em se tratando de estudos clínicos, os dados são inconclusivos com relação à influência e mecanismo de ação no periodonto. Adicionalmente, uma revisão sistemática foi realizada por Hong et al., (2010) os quais concluíram que pacientes pós-tratamento quimioterápico tiveram o índice de placa e o índice gengival maiores que os pacientes saudáveis.

É importante ressaltar que a frequência e a severidade das condições debilitantes frente à quimioterapia dependem de diversos fatores associados ao paciente e à terapia antineoplásica. Existem variáveis importantes que aumentam a susceptibilidade do paciente, dentre elas, temos a droga utilizada, dose, regime quimioterápico e intensidade da imunossupressão (Epstein & Schubert, 1999; Knox et al., 2000; Duncan & Grant, 2003; Brown et al.; 2009). Além disso, as drogas quimioterápicas levam a alterações significativas em diferentes órgãos, podendo se destacar sobre fígado e rim. A CIS é reconhecidamente capaz de causar nefrotoxicidade (Karasawa & Steyger, 2015), principalmente em razão de o rim absorver a cisplatina em concentrações mais elevadas em comparação com outros tecidos (Pabla et al., 2009; Filipski et al. 2009).

Por outro lado, a DP pode exercer efeito sobre o rim pelo aumento da carga inflamatória sistêmica, ocasionando alterações na albumina sérica e níveis de proteína C-reativa (da Costa et al., 2015; Yoshihara et al.; 2017). Deste modo, a DP em conjunto com os efeitos deletérios dos quimioterápicos sobre o rim pode aumentar ainda mais a debilidade do paciente.

2. OBJETIVO

Diante da preocupação em elucidar detalhadamente a associação da influência dos quimioterápicos com a DP, o objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente a influência do quimioterápico CIS, no periodonto saudável e sobre a evolução da PE, bem como a função renal de ratos portadores de PE submetidos ao tratamento com quimioterápico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (**Protocolo nº2014-00542**) (**Anexo1**).

No presente estudo foram utilizados 120 ratos machos entre 3 e 4 meses de idade (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*), pesando aproximadamente 260g, provenientes do biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 5 animais em cada uma, separados de acordo com o grupo, e ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), por um período de 5 dias.

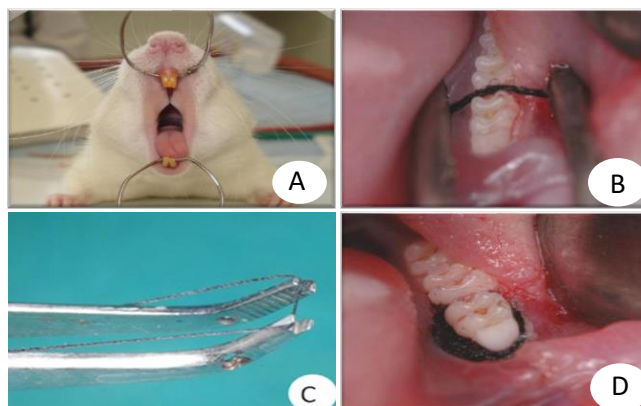
3.2 Sedação e Anestesia

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais foram inicialmente pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrado. Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70mg/Kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa, EUA.) associado 6mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo, SP, Brasil.) aplicados via intramuscular no *biceps femoris* da pata direita. Nos casos em que não se obteve o necessário efeito anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

3.3 Indução da periodontite

Após anestesia geral, todos os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, que permitiu a manutenção da abertura bucal e, de forma adequada, o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de sonda e pinça modificada para este fim, foi adaptado um fio de algodão (Corrente Algodão nº.24; Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil.) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, no nível do sulco gengival sendo mantido nesta posição por meio de nó cirúrgico (Fig. 1).

Figura 1. Procedimentos de indução da periodontite.



Fonte: Elaborado pelo autor. Em (A) Posicionamento do animal na mesa cirúrgica; (B) Acesso ao primeiro molar inferior onde será induzida a doença periodontal; (C) Pinça modificada usada para adaptação do fio de algodão em torno do primeiro molar inferior esquerdo; (D) Fio de algodão adaptado.

3.4 Protocolo medicamentoso – Tratamento quimioterápico

A administração de Solução Salina a 0,9% (Equipex Indústria Farmacêutica. Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) ou Cisplatina (Faudcispla, 10mg/10ml, Libbs Farmacêutica, SP, Brasil) ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de 48 horas entre elas. A primeira dose de cisplatina foi de 5mg/kg (Havelka et al., 2007) e a segunda dose de 2,5mg/kg. A dose do quimioterápico Cisplatina constituiu em uma adaptação para o rato, do protocolo empregado para terapia oncológica em humanos, a qual considera a superfície corpórea para a determinação da dose. (Dubois & Dubois, 1916; Nakasato et al., 2012) (Fig. 2).

Figura 2. Administração do Quimioterápico.



Fonte: Elaborado pelo Autor. Foto demonstrativa da aplicação da medicação por via intraperitoneal.

3.5 Grupos Experimentais e Tratamentos

Utilizando um programa computacional, os animais foram distribuídos em 4 grupos, cada um composto por 30 animais que receberão os seguintes tratamentos:

Grupo SPE-SS: também chamado de grupo sham. Animais sem PE. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneais, com intervalo de 48 horas entre elas, de 0,5 ml de solução salina a 0.9%.

Grupo PE-SS: Animais com PE. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneais, com intervalo de 48 horas entre elas, de 0,5 ml de solução salina a 0.9%. Logo após a primeira injeção, foi realizada a indução da PE no primeiro molar inferior esquerdo.

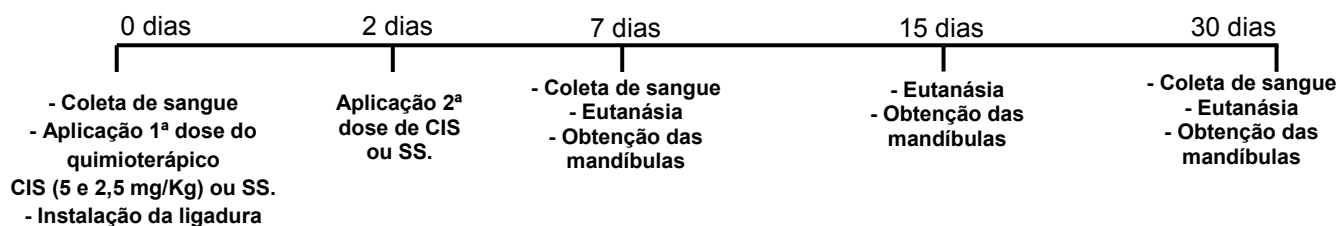
Grupo SPE-CIS: Animais sem PE. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneais, com intervalo de 48 horas entre elas, de 5 mg/kg e 2,5mg/kg de cisplatina respectivamente.

Grupo PE-CIS: Animais com PE. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneais, com intervalo de 48 horas entre elas, de 5 mg/kg e 2,5mg/kg de cisplatina respectivamente. Logo após a primeira injeção, foi realizada a indução da PE no primeiro molar inferior esquerdo.

3.6 Períodos experimentais e obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados pela administração de uma dose letal de Tiopental na dose de 150 mg/kg de peso corporal, aos 7, 15 e 30 dias após a indução da PE. A mandíbula de cada animal foi removida, separada no plano mediano e fixada em formaldeído tamponado a 4%, por um período de 48hrs.

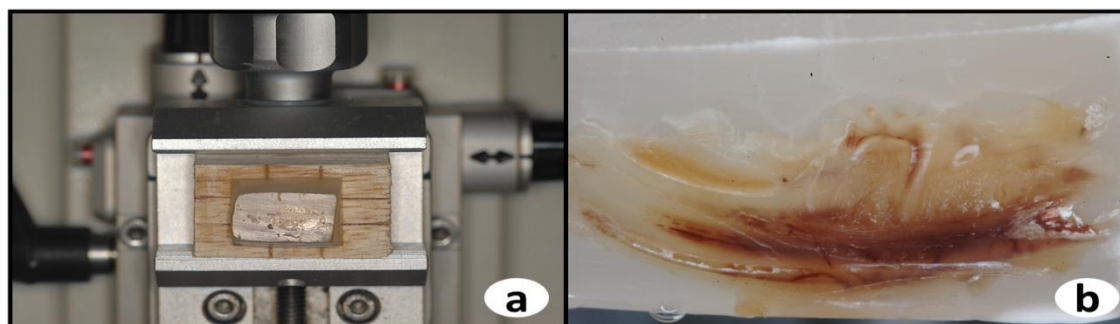
3.7 Linha do tempo



3.8 Processamentos histológicos

As hemi-mandíbulas esquerdas foram lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas para desmineralização em solução de Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) tamponado a 10% por um período de 6 a 8 semanas, com trocas semanais. Estando as peças suficientemente desmineralizadas, estas foram reduzidas, lavadas, desidratadas em séries crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados no sentido méso-distal, com o cuidado de sempre estarem no longo eixo do dente (Fig. 3). Os cortes seriados, com 4 μ m de espessura foram submetidos à técnica de imunoperoxidase indireta.

Figura 3. Cortes histológicos



Fonte: Elaborado pelo autor. Em (A) posicionamento da peça no micrótomo; (B) imagem representativa da peça durante a obtenção dos cortes histológicos.

3.9 Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica da área de furca foi direcionada para os seguintes biomarcadores: 1) Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); 2) Interleucina 1 Beta (IL-1 β). Ambos mediadores endógenos da resposta inflamatória. A seleção das secções imunoistoquímicas foi realizada por um examinador treinado e cego aos grupos experimentais. Foram selecionadas 3 secções histológicas da área de furca, com aumento de 400x. Foram consideradas imunomarcações, as células que apresentaram positividade a marcação, sendo positiva as células que exibiram coloração acastanhada no citoplasma e matriz extracelular (TNF- α , IL-1), independente da intensidade. A imunomarcação foi mensurada via análise semi-quantitativa da imunomarcação no ligamento periodontal e no osso alveolar da área de furca.

3.10 Análise bioquímica do sangue

Foi realizada a coleta de 2,5 mL de sangue de cada animal via punção cardíaca (Fig.4A) em dois momentos, com o objetivo de realização de análises bioquímicas. A primeira punção foi realizada antes da primeira injeção do quimioterápico ou solução salina a 0.9%, e a segunda nos períodos de 7 e 30 dias da eutanásia. Para as análises bioquímicas, o sangue coletado foi acondicionado em micro tubos Eppendorf (Fig.4B) sem anticoagulante e submetidos à centrifugação, e determinadas pelo modo cinético seguindo as normas do fabricante dos kits Ureia Vet e Crea K Vet (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, MG, Brasil) para obtenção do soro, e analisados em espectrofotômetro semi-automatizado (SB-190 Celm, Barueri, SP, Brasil). As análises de creatinina e ureia foram importantes para determinar os danos renais causados pelo quimioterápico e pela PE.

Figura 4. Procedimentos da análise bioquímica.



Fonte: Elaborado pelo autor. Em (A) Punção Cardíaca; (B) Microtubo Eppendorf; (C) Centrifuga utilizada.

3.11 Análise estatística

A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos e períodos foi testada utilizando o software Bioestat 5.0 (Windows XP, Sonopress Brazilian Industry, Manaus, AM, Brasil). Após análise da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$), a análise intragrupo e intergrupo foram realizados pela análise de variância a dois critérios (ANOVA $p \leq 0,05$). Quando o ANOVA detectou diferença estatística as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

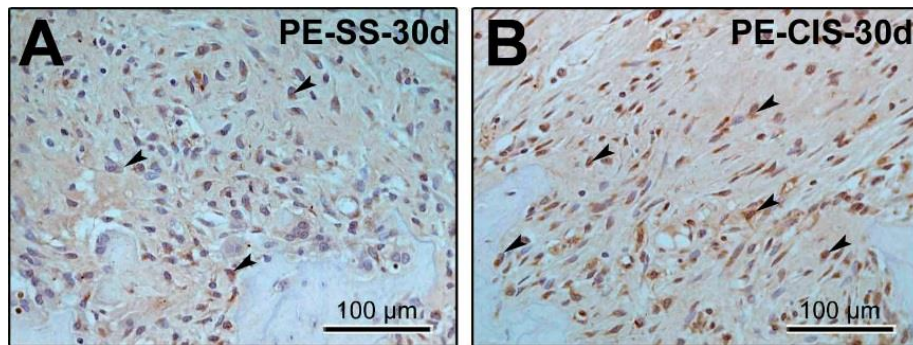
4.1 Resultados da análise imunoistoquímica

Os resultados da análise imunoistoquímica para TNF α e IL-1 β estão representados nas tabelas 1 e 2. Nos ratos tratados com CIS, o padrão de imunomarcção das duas principais citocinas com atividade pró-inflamatórias, TNF α e IL-1 β , é maior nos tecidos periodontais quando comparado com os ratos controle, tratados com SS. Nos ratos controle, aos 7 e 15 dias após a instalação da ligadura, o padrão de imunomarcção tanto para TNF α quanto para IL-1 β se mostraram variando de alto à moderado, sendo que aos 30 dias da instalação da ligadura prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção. Nos ratos tratados com CIS e PE o padrão de imunomarcção para TNF α e IL-1 β se mostra alto aos 7, 15 e 30 dias após a instalação da ligadura.

Tabela 1. Padrão de imunomarcção de células imunorreativas à TNF α na região de furca do primeiro molar, para cada grupo e período.

TNF α	
GRUPOS	PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO
SPE-SS-7d	<i>prevaleceu um <u>baixo</u> padrão de imunomarcção</i>
SPE-SS-15d	<i>prevaleceu um <u>baixo</u> padrão de imunomarcção</i>
SPE-SS-30d	<i>prevaleceu um <u>baixo</u> padrão de imunomarcção</i>
SPE-CIS-7d	<i>prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção</i>
SPE-CIS-15d	<i>prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção</i>
SPE-CIS-30d	<i>prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção</i>
PE-SS-7d	<i><u>alto/moderado</u> padrão de imunomarcção</i>
PE-SS-15d	<i><u>alto/moderado</u> padrão de imunomarcção</i>
PE-SS-30d	<i>prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção</i>
PE-CIS-7d	<i>prevaleceu um <u>alto</u> padrão de imunomarcção</i>
PE-CIS-15d	<i>prevaleceu um <u>alto</u> padrão de imunomarcção</i>
PE-CIS-30d	<i>prevaleceu um <u>alto</u> padrão de imunomarcção</i>

Figura 5. Padrão de imunomarcção para TNF α na região de furca do primeiro molar inferior após 30 dias da indução da PE.

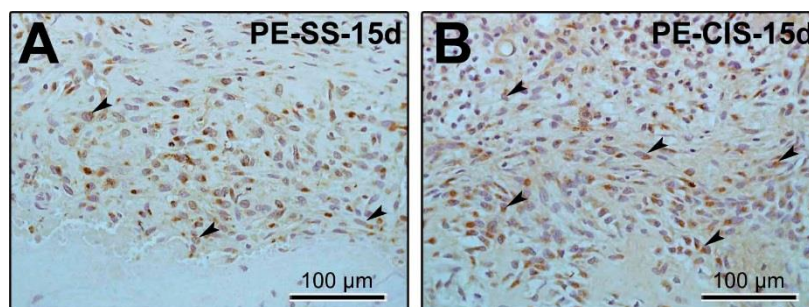


Fonte: Elaborado pelo autor. Em (A) PE-SS, (B) PE-CIS. Símbolos: Setas pretas, células TNF α imunopositivas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 μ m.

Tabela 2. Padrão de imunomarcção de células imunorreativas à IL-1 β na região de furca do primeiro molar, para cada grupo e período.

IL-1 β	
GRUPOS	PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO
SPE-SS-7d	prevaleceu um <u>baixo</u> padrão de imunomarcção
SPE-SS-15d	prevaleceu um <u>baixo</u> padrão de imunomarcção
SPE-SS-30d	prevaleceu um <u>baixo</u> padrão de imunomarcção
SPE-CIS-7d	prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção
SPE-CIS-15d	prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção
SPE-CIS-30d	prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção
PE-SS-7d	<u>alto/moderado</u> padrão de imunomarcção
PE-SS-15d	<u>alto/moderado</u> padrão de imunomarcção
PE-SS-30d	prevaleceu um <u>moderado</u> padrão de imunomarcção
PE-CIS-7d	prevaleceu um <u>alto</u> padrão de imunomarcção
PE-CIS-15d	prevaleceu um <u>alto</u> padrão de imunomarcção
PE-CIS-30d	prevaleceu um <u>alto</u> padrão de imunomarcção

Figura 6. Padrão de imunomarcção para IL-1 β na região de furca do primeiro molar inferior após 15 dias da indução da PE.



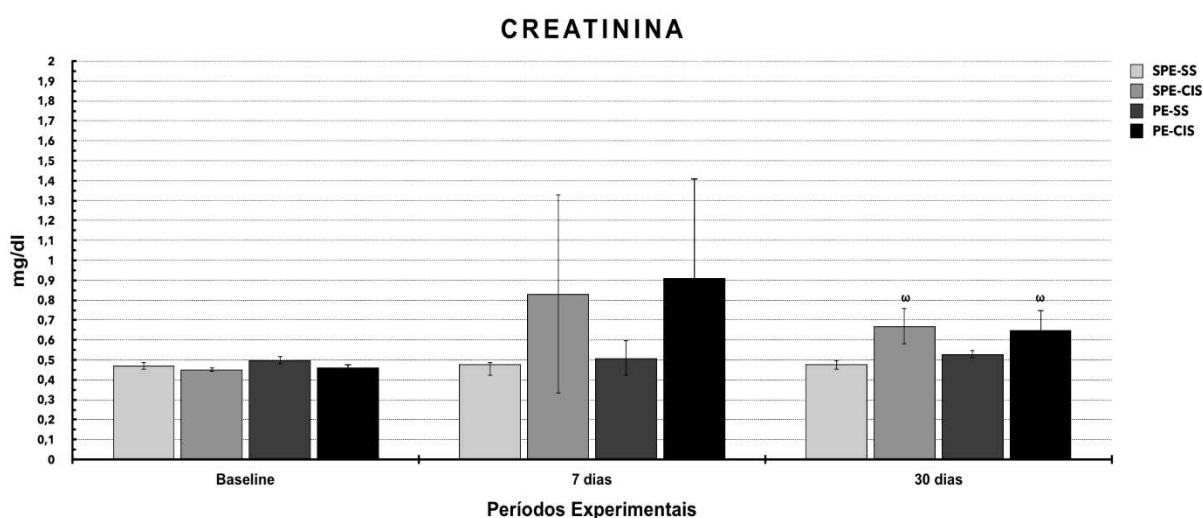
Fonte: Elaborado pelo autor. Em (A) PE-SS, (B) PE-CIS. Símbolos: Setas pretas, células IL-1 β imunopositivas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 μ m.

4.2 Resultados da análise bioquímica do sangue

Resultado da análise de Creatinina no sangue

Não houve diferença significativa na análise intragrupo. Na análise intergrupos o grupo SPE-SS apresentou menor nível de creatinina aos 30 dias comparado com SPE-CIS e PE-CIS.

Figura 7. Gráfico mostrando os níveis de Creatinina em cada grupo no decorrer dos períodos.

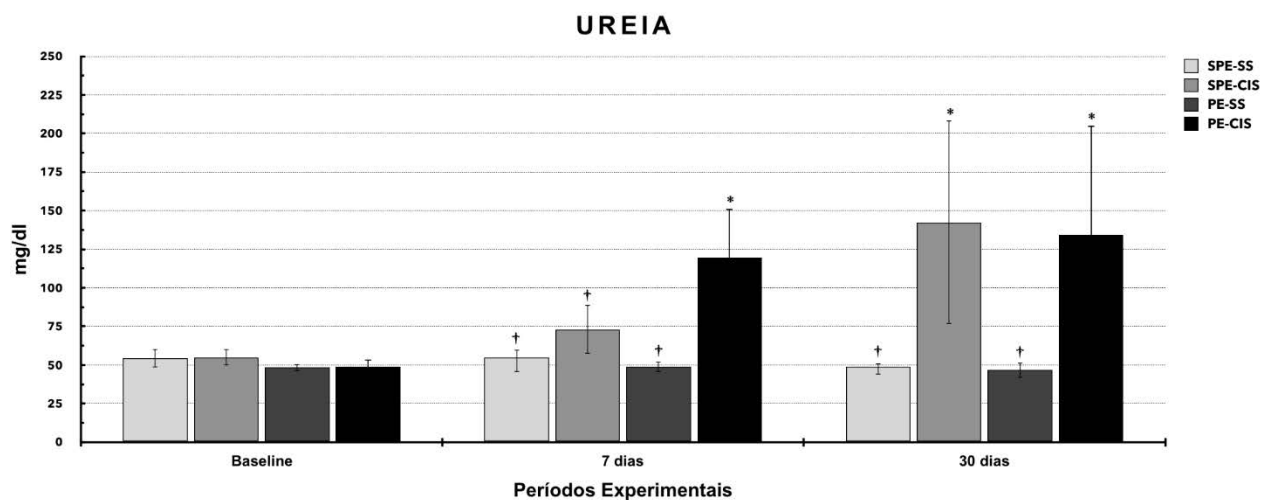


Fonte: Elaborado pelo autor. Gráfico representando os níveis de Creatinina de acordo com cada grupo e período. Abreviações: ω Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p < 0,05$).

Resultado da análise de Ureia no sangue

Na análise intragrupo o período Baseline apresentou maior nível de Uréia com 7 dias no grupo PE-CIS, e com 30 dias nos grupos SPE-CIS e PE-CIS ($p \leq 0,05$). Na análise intergrupos, o grupo PE-CIS apresentou maior nível de uréia aos 7 dias comparado com SPE-CIS e PE-SS e aos 30 dias com SPE-SS e PE-SS ($p \leq 0,05$).

Figura 8. Gráfico mostrando os níveis de Ureia em cada grupo no decorrer dos períodos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Gráfico mostrando os níveis de Ureia de acordo com cada grupo e período. Abreviações: * Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com Baseline. † Diferença estatisticamente significativa com PE-CIS nos mesmos períodos. (teste ANOVA, teste de Tukey) ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Este estudo acessou a influência do quimioterápico CIS sobre a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , tanto no periodonto saudável quanto durante a progressão da PE, bem como o efeito sinérgico entre CIS e PE sobre a função renal.

As drogas antineoplásicas, embora comumente utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer, não tem suas atividades restritas apenas às células tumorais, podendo causar danos genotóxicos em células saudáveis (Mc Guire, 2002; Arias, 2008.). Portanto, sabendo-se que a quimioterapia pode comprometer o estado geral do paciente, existe uma grande preocupação em se conhecer os efeitos dos quimioterápicos nos tecidos que podem ser afetados por estas drogas e seu regime de administração. Como por exemplo, a interação dos quimioterápicos com condições inflamatórias pré-existentes, como a periodontite, podendo interferir agravando a progressão da DP local (Garcia et al., 2015; Theodoro et al., 2016; Theodoro et al., 2017;), ou mesmo potencializando danos sistêmicos, em decorrência do efeito sinérgico da toxicidade dos quimioterápicos em determinados órgãos (Abdou et al., 2014; Li et al., 2015; Tam et al., 2015), associado com os danos sistêmicos ocasionados pela inflamação periodontal (Yoshihara et al., 2017; Han et al., 2016; da Costa et al., 2015).

Estudos relataram que a CIS é capaz de induzir o aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF α , proteína quimiotática de monócitos-1 e proteína inflamatória de macrófagos-2 em tecidos renais (Miller et al. 2010; Ozkok & Edelstein, 2014). Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 estimulam a produção de quimiocinas, induzem a expressão de outros mediadores inflamatórios que potencializam a resposta inflamatória, e atuam como potentes indutores da reabsorção óssea (Graves et al., 2003). Stine et al., (2014) observaram que a CIS promoveu um efeito negativo sobre o processo de reparo em defeitos ósseos em tibia de rato.

Em nossos resultados, no grupo SPE-CIS, o nível das duas citocinas, TNF α e IL-1 β , foi maior nos tecidos periodontais quando comparado com o grupo SPE-SS, comprovando a capacidade da CIS de induzir o aumento das citocinas pró-inflamatórias nos tecidos, entretanto, o grupo PE-CIS apresentou uma maior padrão de imunomarcção quando comparado com PE-SS, podendo ser um dos fatores que

contribuem com o aumento da severidade da doença periodontal. Enquanto no grupo PE-SS houve uma redução de imunomarcção de TNF- α e IL-1 no decorrer dos períodos, no grupo PE-CIS prevaleceu um alto padrão de imunomarcção em todos os períodos experimentais. Tal resultado demonstra um processo inflamatório mais intenso e por um período prolongado, causado pela PE nos tecidos periodontais, quando utilizado o quimioterápico CIS. Frente à exarcebação e a duração prolongada da resposta inflamatória, podemos presumir uma maior capacidade de destruição do osso alveolar, tendo em vista que as citocinas TNF- α e IL-1, quando produzidas em quantidade excessiva, podem induzir mecanismos inflamatórios que resultam em reabsorção óssea, inibição da síntese do colágeno e ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), causando destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo, e reduzindo significativamente a capacidade de formação óssea reparativa (Graves et al., 2008; Preshaw et al., 2011.).

Sabe-se que mecanismos infecciosos e inflamatórios relacionados à DP (Van Dyke & Van Winkelhoff, 2013) são capazes de alterar diversas condições sistêmicas (Chapple et al., 2013; Chambrone et al., 2013; Papanou, 2015; Han et al., 2016), o que associada à capacidade de causar nefrotoxicidade da CIS (Karasawa & Steyger, 2015), pode potencializar o dano causado a esse órgão. Em nosso estudo não houve diferença significativa nos níveis de creatinina e uréia entre os grupos SPE-SS e PE-SS, corroborando com estudo realizado por França et al., (2017) que não demonstrou alterações significativas nos marcadores séricos das funções renais em ratos portadores de PE. Porém esse mesmo estudo encontrou mudanças significativas na histologia renal, no stress oxidativo renal e na peroxidação lipídica associada à periodontite. Portanto podemos supor que os parâmetros avaliados em nosso estudo não foram suficientes para detectar as possíveis alterações renais decorrentes da PE. Por outro lado, diversos estudos concluíram que em pacientes portadores de DP, por apresentarem níveis elevados de alguns marcadores inflamatórios na circulação como albumina e PCR (da Costa et al., 2015), foi encontrada uma associação significativa entre a inflamação periodontal e a incidência cumulativa de deterioração da função renal (Chambrone et al., 2013; Yoshihara et al., 2017; Ricardo et al., 2015).

Nos grupos SPE-CIS e PE-CIS não foi observada diferença significativa nos níveis de creatinina entre eles no decorrer dos períodos, havendo diferença significativa aos 30 dias com o grupo SPE-SS. Na avaliação dos níveis de ureia foi

possível observar uma elevação nos grupos SPE-CIS e PE-CIS aos 7 e 30 dias comparados ao baseline, evidenciando os danos renais ocasionados pelo quimioterápico CIS (Pabla et al., 2009). Adicionalmente, o grupo PE-CIS apresentou, de maneira significativa, maiores níveis de ureia aos 7 dias comparados com SPE-CIS. Deste modo podemos supor que a PE agravou os danos causados pelo quimioterápico CIS ao funcionamento renal logo nos períodos iniciais. Porém, diante da significativa elevação dos níveis de ureia aos 30 dias nos grupos SPE-CIS e PE-CIS podemos inferir que os danos renais causados pelo quimioterápico CIS se sobrepôs aos demais fatores contribuintes para o agravamento da lesão. A CIS acumula-se em altas concentrações nas células tubulares renais, levando a lesões tubulares e morte celular. Orchard et al., (2014) encontraram níveis circulantes de CIS circulantes no plasma após 20 anos da administração da droga, fato que exige atenção, pois efeitos renais prolongados podem ser esperados.

É importante ressaltar que o modelo experimental adotado mesmo sendo adequado e amplamente utilizado para a avaliação da toxicidade tecidual de quimioterápicos (Pabla et al., 2009; Al-asmari et al., 2016) ou da DP, apresenta limitações e deve ser visto com cautela quanto a interação entre DP e o agravamento de lesões renais causadas pelos quimioterápicos. Além disso, vale salientar que além das análises bioquímicas propostas no presente estudo, outras análises são necessárias para melhor elucidar a interrelação entre lesões renais causadas pela CIS e a PE.

Diante dos resultados podemos afirmar que a CIS é capaz de aumentar a expressão de TNF- α e IL-1 nos tecidos periodontais, sendo que na presença de PE irá levar à exacerbação do processo inflamatório, presumindo maior perda óssea. Adicionalmente, a PE agravou os danos renais causados pela CIS nos períodos iniciais.

Elucidar os fatores que contribuem negativamente no estado geral dos pacientes submetidos ao tratamento oncológico com quimioterápicos é fundamental para que se elabore adequadas terapias de suporte aos protocolos terapêuticos estabelecidos, minimizando os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida do paciente. Protocolos terapêuticos para tratamento da DP, de preferência prévios à administração dos quimioterápicos, são necessários para minimizar o agravamento da DP pelos quimioterápicos e os danos renais causados pelo efeito sinérgico da DP com os quimioterápicos.

6. CONCLUSÃO

Sendo assim, de acordo com os resultados encontrados e dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que a CIS influenciou o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos periodontais saudáveis, além de, na presença da PE, ter exacerbado o processo inflamatório na região de furca. Adicionalmente, a PE aumentou os níveis séricos de ureia, indicando um agravamento aos danos renais causados pela CIS em períodos iniciais.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H.M.; HUSSIEN, H.M.; YOUSEF, M.I. Deleterious effects of cypermethrin on rat liver and kidney: protective role of sesame oil. **J Environ Sci Health B**. v. 47, p. 306-14, 2012.

AL-ASMARI, A.K.; AL-ZAHRANI, A.M.; KHAN, A.Q.; AL-SHAHRANI; H.M.; ALI, A.L.; AMRI, M. Taurine ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats: A biochemical and histological study. **Hum Exp Toxicol**. 35(1):10-20, 2016.

ANDERSEN, R.; LOEBEL, N.; HAMMOND, D.; WILSON M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planning. **J Clin Dent**. vol. 18, p.34-8, 2007.

ARIAS, J.L. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. **Molecules** v. 13, p. 2340-2369, 2008.

BARTH E.; ROENNINGEN H.; SOLHEIM L.F.; SAETHREN B. Effect of cis-platinum on bone ingrowth into porous fiber titanium. Mechanical and biochemical correlations. **Int J Oral Maxillofac Implants**. v. 1, p. 123-7, 1986.

BROWN, C.G.; BECK, S.L.; PETERSON, D.E; MCGUIRE, D.B.; DUDLEY, W.N.; MOONEY, K.H. Patterns of sore mouth in outpatients with cancer receiving chemotherapy. **Support Care Cancer**. v. 17, p. 413-28, 2009.

CEKICI A.; KANTARCI A.; HASTURK H.; et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**. v.64, p.57-80, 2014.

CHAMBRONE, L; FOZ, A.M.; GUGLIELMETTI, M.R.; PANNUTI, C.M.; ARTESE, H.P.; FERES, M.; ROMITO, G.A. Periodontitis and chronic kidney disease: a systematic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. **J Clin Periodontol** 40(5):443-56, 2013.

CHAPPLE, I.L.; GENCO, R.; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **J Periodontol**. v. 84, p. S106- 112, 2013.

CHO, J.M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.R.; PARK, H.M.; KWAK, M.K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. **Cancer Lett.** v. 260, p. 96–108, 2008.

DA COSTA, T.A.; SILVA, M.J.; ALVES, P.M.; et al. Inflammation Biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. **Mediators Inflamm.** v.9, p.837-82, 2015.

DEWIT, L. Combined treatment of radiation and cisdiamminedichloroplatinum (II): a review of experimental and clinical data. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** v. 13, p. 403-426, 1987.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis- causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther.** v.18, p. 853-74, 2003.

DJURIC, M., CAKIC, S., HADZI-MIHAILOVIC, M., PETROVIC, D. & JANKOVIC, L. Oral status in patients receiving 5-fluorouracil for colorectal cancer. **Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology.** v.15, p. 475-479, 2010.

DOSSEVA-PANOVA, V.T; POPOVA, C.L; PANOVA, V.E. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. **Folia Med (Plovdiv),** v. 56(3) p. 152-60.

EHRHART N.; EURELL J.A.; TOMMASINI M.; CONSTABLE P.D.; JOHNSON A.L.; FERETTI A. Effect of cisplatin on bone transport osteogenesis in dogs. *Am J Vet Res.* V.63, p.703-11, 2002.

EPSTEIN, J.B.; SCHUBERT, M.M. **Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy.** **Oral Surg Oral Med Oral Patho.** v.88, p.273-6, 1999.

FILIPSKI, K.K.; MATHIJSEN, R.H.; MIKKELSEN, T.S.; SCHINKEL, A.H.; SPARREBOOM, A. Contribution of organic cation transporter OCT2 to cisplatin-induced nephrotoxicity. **Clin Pharmacol Ther.** v.86, p. 396-402, 2009.

FRANÇA, L.F.C.; VASCONCELOS, A.C.C.G.; DA SILVA, F.R.P.; ALVES, E.H.P.; CARVALHO, J.S.; LENARDO, D.D.; DE SOUZA, L.K.M.; BARBOSA, A.L.R.; MEDEIROS, J.R.; DE OLIVEIRA, J.S.; VASCONCELOS, D.F.P. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. **J Clin Periodontol.** 44(6):568-576, 2017.

GARCIA, V.G.; NOVAES, V.C.; de ALMEIDA, J.M.; LONGO M.; ERVOLINO, E.; BONFIM, SR.; THEODORO, L.H. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**, Dec 18, 2015. [Epubaheadofprint]

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology** v. 79, p.1585–1591, 2008.

GRAVES DT, COCHRAN D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**. V.74, p.391-401, 2003.

GUCHELAAR, H.J.; VERMES, I.; KOOPMANS, R.P.; EUTELINGSPERGER, C.P.; HAANEN, C. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 42, p. 77-83,1998.

HALF, E.; ARBER, N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. **Expert Opin Pharmacother**, v.10, p. 211-219, 2009.

HAN P, SUN D, YANG J. Interaction between periodontitis and liver diseases. **Biomed Rep**, v. 5, p. 267-276, 2016.

HONG, C.H.L.; NAPENAS, J.J.; HODGSON, B.D. et al. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. **Supportive Care in Cancer**. v.18, p. 1007-1021, 2010.

JENSEN, S. B., MOURIDSEN, H.T., BERGMANN, O. J., REIBEL, J., BRÜNNER, N. & NAUNTOFTE, B. Oral mucosal lesions, microbial changes, and taste disturbances induced by adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics**. v.106, p. 217-26, 2008.

KARASAWA, T.; STEYGER, P.S. An integrad view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicol Lett**. v.237, p.219-227, 2015.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res**. v.478, p. 23-43, 2001.

KIM, S.S.; JACKSON-BOETERS, L.; DARLING, M.R.; RIEDER, M.J.; HAMILTON, D.W. Nifedipine induces periostin expression in gingival fibroblasts through TGF-beta. **Journal of Dental Research**. v. 92, p. 1022-1028, 2012.

KNOX, J.J.; PUODZIUNAS, A.L.V.; FELD, R. Chemotherapy-induced oral mucositis. Prevention and management. **Drugs Aging**. v.14, p.257-67, 2000.

KOBERLE, B.; TOMICIC, M.T.; USANOVA, S.; KAINA, B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. **Biochim Biophys Acta**. In press, 2010.

LI, D.; WANG, X.; LIU, B.; LIU, Y.; ZENG, Z.; LU, L.; ZHENG, Z.; LI, B.; ZHENG, Z. Exercises in hot and humid environment caused liver injury in rat model. **PLoS One**. 30;9(12): e111741. 2014.

LORCH, J.H.; GOLOUBEVA, O.; HADDAD, R.I.; CULLEN, K.; SARLIS, N.; TISHLER, R.; TAN, M.; FASCIANO, J.; SAMMARTINO, D.E.; POSNER, M.R.; TAX 324 Study Group. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol**. v. 12, p. 153-9, 2011.

MAZZEO, M.A., LINARES, J.A., CAMPOS, M.L., BUSAMIA, B.E., DUBERSARSKY, C., LAVARDA, M., JARCHUM, G. & FINKELBERG, A.B. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. **Medicina oral, Patología oral y Cirugía bucal**. v.14, p.108-113, 2009.

McGUIRE, D.B. Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than mucositis and mouthwash. **Cancer Pract**. V. 10, p.179-91, 2002.

MILLER, E.H; QUINN A.L. Dental considerations in the management of head and neck cancer patients. **Otolaryngol Clin North Am**. vol.39, p. 319-29, 2006.

MILLER, R.P; TADAGAVADI, R.K; RAMESH, G; REEVES, W.B. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins (Basel)**. v. 2(11), p. 2490-518, 2010.

NAIDU, M.U.; RAMANA, G.V.; RANI, P.U.; MOHAN, I.K.; SUMAN, A.; ROY, P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. **Neoplasia** v. 6, p. 423-431, 2004.

OGAWA, K., UENO, T., KATO, K., NISHITANI, H., AKIYOSHI, K., IWASA, S., NAKAJIMA, T.E., HAMAGUCHI, T., YAMADA, Y., HOSOKAWA, A., SUGIYAMA, T. & SHIMADA, Y. A retrospective analysis of periodontitis during bevacizumab treatment in metastatic colorectal cancer patients. **International Journal of Clinical Oncology**. (on line) doi: 10.1007/s10147-012-0478-5, 2012.

OZKOK, A; EDELSTEIN, C.L. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. **Biomed Res Int**.doi: 10.1155/2014/967826, 2014.

PABLA, N.; MURPHY, R.F.; LIU, K.; DONG, Z. The copper transporter contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. **Am J Physiol Renal Physiol**. v.296, p. 505-511, 2009.

PANG, S.K.; YU, C.W.; AU-YEUNG, S.C.F.; HO, Y.P. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 363, p.235-240, 2007.

PAPAPANOU, P.N. Systemic effects of periodontitis: lessons learned from research on atherosclerotic vascular disease and adverse pregnancy outcomes. **Int Dent J**. v. 65, p. 283-291, 2015.

PRESHAW PM, TAYLOR JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **J. Clin. Periodontol** v. 38, p.60-84, 2011.

RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat Rev**. v. 33, p.9-23, 2007.

SALTZ, L.B.; KEMENY, N.E. Adjuvant chemotherapy of Colorectal Cancer. **Oncologist**, v.1 (1&2), p. 22-29,1996.

RICARDO, A.C.; ATHAVALE, A.; CHEN, J.; HAMPOLE, H.; GARSIDE, D.; MARUCHA, P.; LASH, J.P. Periodontal disease, chronic kidney disease and mortality: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **BMC Nephrol**. V. 7, p.16:97, 2015.

STINE, K.C.; WAHL, E.C.; LIU, L.; SKINNER, R.A.; VANDERSCHILDEN, J.; BUNN, R.C.; MONTGOMERY, C.O.; SUVA, L.J.; ARONSON, J.; BECTON, D.L.; NICHOLAS, R.W.; SWEARINGEN, C.J.; LUMPKIN, C.K. JR. Cisplatin inhibits bone healing during distraction osteogenesis. **J Orthop Res.** v. 32, p. 464-70, 2014.

SURENDIRAN, A.; BALAMURUGAN, N.; GUNASEELAN, K.; AKTHAR, S.; REDDY, K.S.; ADITHAN C. Adverse drug reaction profile of cisplatin-based chemotherapy regimen in a tertiary care hospital in India: An evaluative study. **Indian J Pharmacol.** vol. 42, p. 40-3, 2010.

TAM, V.H.; LEDESMA, K.R.; BOWERS, D.R.; ZHOU, J.; TROUNG, L.D. Kidney injury associated with telavancin dosing regimen in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 59, p. 2930-2933, 2015.

TAYLOR, S.G.; MURTHY, A.K.; VANNETZEL, J.M.; COLIN, P.; DRAY, M.; CALDARELLI, D.D.; SHOT, S.; VOKES, E.; SHOWEL, J.L.; HUTCHINSON, J.C.; et al. Randomized comparison of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil infusion followed by radiation versus concomitant treatment in advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol.** v. 12, p. 385-395, 1994.

THEODORO, L.H; LONGO, M; ERVOLINO, E;DUQUE, C; FERRO-ALVES M.L; ASSEM, N.Z; LOUZADA, L.M; GARCIA, V.G.Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. **J Periodontal Res.** doi: 10.1111, 2016.

THEODORO, L.H.; LONG, M.; NOVAES, V.C.N.; et al. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**, 2017. Doi: 10.1007/s00520-017-3738-0. [Epub ahead of print]

TSUKAMOTO, Y.; USUI, M.; YAMAMOTO, G.; TAKAGI, Y.; TACHIKAWA, T.; YAMAMOTO, M.; NAKAMURA, M. Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. **Journal of Periodontal Research** v. 47, p. 750-757, 2012.

VAN DYKE, T.E.; VAN WINKELHOFF, A.J. Infection and inflammatory mechanisms. **J Clin Periodontol** 40 Suppl 14:S1-7, 2013.

VERMORKEN, J.B; PEYRADE, F.; KRAUSS, J.; MESIA, R.; REMENAR, E.; GAULER, T.C; et al. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). **Ann Oncol.** v. 25, p.682-688, 2014.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov.** v.4, p. 307-20, 2005.

World Health Organization/Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 23 de março de 2018.

WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **ChemBiol Interact.** v. 147, p. 309–18, 2004.

YOSHIHARA, A; SUGITA, N.; IWASAKI, M.; WANG Y.; MIYAZAKI H.; YOSHIE, H.; NAKAMURA, K. Relationship between renal function and periodontal disease in community-dwelling elderly women with different genotypes. **J Clin Periodontol.** v.44, p. 484-89, 2017.

YOUNG, D.R.L; SHIH, L.Y.; ROCK, M.G.; FRASSICA F.J.; VIROLAINEN P.; CHAO, E.Y. Effect of cisplatin chemotherapy on extracortical tissue formation in canine diaphyseal segmental replacement. **J Orthop Res** v. 15, n. 5,p.773-80, 1997.

ZHANG, J.; LIU, L.; GONG, Y.; ZHENG, X.; YANG, M.; CUI, J.; SHEN, S. Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum(II) complexes. **Eur J Med Chem.**v. 44, p. 2322-7, 2009.

Anexo A – Certificado da Aprovação do Comitê 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 "Influência de drogas quimioterápicas na evolução da periodontite experimental: estudo em ratos", Processo FOA nº 2014-00542, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de maio de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Março de 2017.

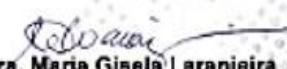
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Abril de 2017.

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 10, 2017.

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


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-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