



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – Disciplina de Periodontia

GIOVANI LOPES FERNANDES

**“Análise imunoistoquímica no tecido ósseo alveolar da
influência da cisplatina na periodontite experimental em
ratos”**

ARAÇATUBA – SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – Disciplina de Periodontia

GIOVANI LOPES FERNANDES

**“Análise imunoistoquímica no tecido ósseo alveolar da
influência da cisplatina na periodontite experimental em
ratos”**

**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

Dedicatória

A Deus

Muitos dizem que tenho a sorte grande para as coisas da vida, porém costumo dizer que na verdade eu tenho um Deus muito grande. E se hoje estou conquistando mais um sonho, devo tudo isso à Ele.

Portanto, obrigado meu Deus por fazer parte da minha história de uma forma tão grandiosa e tão ativa. Obrigado por essa fase que está se encerrando, pois até nos momentos difíceis o senhor me provou que sou capaz de vencer e merecer os presentes que a vida me traz. Te amo!

A minha Família

*Minha mãe **Silvana Lopes** e meu pai **Aparecido Fernandes**.*

Que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e não seria diferente na minha vida acadêmica. Obrigado por me formar primeiramente como ser humano capaz de amar e ser amado.

Obrigado também por sonhar esse sonho comigo e me ajudar a realiza-lo. Talvez acreditaram que seria mais fácil, talvez foi mais difícil para vocês do que para mim. Sei de cada esforço emocional, físico e financeiro que fizeram nesses anos. E hoje posso dizer à vocês que valeu a pena. Por isso essa conquista não é minha, é NOSSA! Amo vocês.

*Ao meu avô **Valdemar Lopes**, por ter feito o possível e o impossível para ver a minha felicidade enquanto pode viver ao meu lado. Seu imensurável amor por mim, me fez basicamente quem eu sou. Por isso obrigado vô por me ajudar tanto nesses últimos anos. O amor que nos une é bem maior que sua ausência física. Sei que está comemorando comigo, com um sorriso largo no rosto dizendo: “Esse é meu neto!” Te amarei para sempre.*

Agradecimentos

Especiais

*A toda minha **família**. Avós, tias, tios, primos e meus segundos pais, Carla e Cristiano. Todos vocês ajudaram de forma direta ou indireta para que eu concluísse essa graduação e minha gratidão será eterna. Em especial, a minha tia **Rosemari Fernandes**, por toda ajuda e amor que depositou em mim enquanto pode viver. Amo todos vocês.*

*A minha irmã, **Mayara Lopes Fernandes** que me ajuda diariamente. Principalmente nas pequenas que coisas que fazem toda a diferença. Obrigado por todo carinho e companheirismo desses anos. Não poderia ter outra madrinha de formatura. Te amo!*

*Ao professor **Juliano Milanezi de Almeida** que me acolheu desde o primeiro ano de faculdade, não só como um novo aluno orientado, mas como um filho. Tê-lo como orientador foi um dos grandes cuidados de Deus na minha vida. Me fazendo sempre enxergar que eu poderia ser melhor, me alertando das más condutas, puxando minha orelha quando necessário e sempre disposto para me ajudar, seja qual for a situação. Obrigado também por dividir suas imensuráveis qualidades como profissional. Te admiro muito como Cirurgião, professor, pai e amigo.*

*Ao professor **Edilson Ervolino** que foi o primeiro a enxergar em mim e na clara, alunos potenciais para se desenvolver algo. Foi o intermediário até o prof. Juliano, demonstrando sua confiança em nós. Te admiro professor por querer ajudar sempre os que estão a sua volta. Além de um professor com muita aula excepcional, és amigo, brincalhão, sempre com um sorriso no rosto, mesmo com tantas responsabilidades. Obrigado por todo aprendizado como profissional e pessoa.*

*A **Clara Possarle Cunha**, a irmã que a Araçatuba me presenteou para amar e cuidar; ser cuidado e ser amado. Sentimento este que nasceu rápido e recíproco. Não consigo imaginar todos esses anos sem você do meu lado. Obrigado por nunca ter desistido de mim, mesmo nas vezes que nem eu acreditava que eu poderia ser melhor. Juntos nos tornamos fortes. Passamos por desafios que jamais conseguiríamos sozinhos. Vivemos tantas coisas que minha memória até falhará, mas no meu coração seu lugar sempre existirá. Sentirei muito sua falta nos meus dias, porém sei que onde estiver estará brilhando e conquistando seus sonhos sendo muito feliz. Nunca esqueça que sua felicidade sempre será a minha também. Te amo!*

Giovani Lopes Fernandes

*Aos meus amigos de sala, em especial, **Fernanda, Juliana, Ricardo, Wesley**, que nesses 6 anos compartilhei minhas alegrias, tristezas, defeitos e qualidades. Obrigado por fazer de Araçatuba um lugar mais fácil de conviver. Levarei vocês sempre comigo por onde eu for. Que nossos sonhos se realizem, e que possamos nos torna profissionais exemplares. Amo vocês!*

*A **Vivian Noronha Novaes**, que me acolheu de braços aberto na periodontia, sempre disposta a ensinar e cuidar de todos alunos como seus filhos também. Obrigado por sempre estar ao meu lado, me motivando e mostrando o quanto eu posso ser útil e agradável aqueles que estão a minha volta. Com meu bom humor que te contagia, e sua alegria recíproca, me faz entender que é possível trabalhar bem sem deixar de se divertir, proporcionando um ambiente de trabalho muito mais leve.*

*Aos meus amigos e colegas de departamento desses 5 anos, **Bianca, Fred, Nathalia, Henrique, David, Breno e Clara**. A presença de vocês em cada experimento, clínica e confraternizações tornava tudo mais agradável e gostoso de se fazer. Foram muitas histórias e risadas durante todo esse tempo. Memórias que ficaram pra sempre! Obrigado também por me fazerem uma pessoa melhor. Desejo a todos vocês uma carreira brilhante!*

*Aos meus amigos de Pompéia que mesmo sugando todas as minhas energias de um final de semana, me retribuía com um amor e um carinho que poucas pessoas tem oportunidade de receber dentro de muitas amizades. Nesses anos vocês riram e choraram comigo; acertaram e erraram comigo; E além de tudo supriram todas as minhas carências por estar em uma fase desafiadora e longe de casa. **Obrigado Lize, Jessica, Bruno, Gustavo, Gisele, Gabi, Giovanna, Julia, André, Lipe, Caique, Vitória Bezerra, Vitoria Melo, Yan, Fabiano, Rafa, Tati, Leticia, Camila, Nati, Mateus e Jessica**. Amo cada um de forma única.*

Agradecimentos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de cursar Odontologia em uma das Universidades mais reconhecidas do país.

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo 2015/04639-1).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico – CNPQ, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

A todos os meus professores da Graduação, que foram e são tão importantes não só para a minha, mas para a excelente formação dos alunos desta Universidade.

Epígrafe

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só.

Mas sonho que se sonha junto é realidade.”

Raul Seixas

FERNANDES, GL. **Análise Imunoistoquímica no Tecido Ósseo Alveolar da Influência da Cisplatina na Periodontite Experimental em Ratos.** Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba: UNESP - Univ. Estadual Paulista; 2018.

Resumo

Constitui propósito do presente estudo em animais, avaliar via análise fotométrica, microtomográfica (micro-CT) e imunoistoquímica, a influência da droga quimioterápica Cisplatina (CIS) sobre o metabolismo do osso alveolar frente à evolução da periodontite experimental (PE) em ratos. No presente estudo foram utilizados 120 ratos machos distribuídos seguindo uma tabela gerada por um programa de computador em 4 grupos, cada um composto por 30 animais. Grupo SPE-SS: também chamado de grupo sham. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 48 horas entre elas de 0,5 ml de solução salina 0.9% (SS). Nestes animais não foi induzida a PE. Grupo PE-SS: os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 48 horas entre elas de 0,5 ml de SS. Logo após a primeira injeção, foi realizada a indução da PE nos primeiros molares inferiores direito e esquerdo. Grupo SPE-CIS: os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneal com intervalo de 48 horas entre elas de 5 mg/kg e 2,5mg/kg de Cisplatina (CIS) respectivamente. Nestes animais não foi induzida a PE. Grupo PE-CIS: os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneal com intervalo de 48 horas entre elas de 5 mg/kg e 2,5mg/kg de CIS respectivamente. Logo após a primeira injeção, foi realizada a indução da PE nos primeiros molares inferiores esquerdo e direito. Para indução da PE foi adaptado um fio de algodão número 24 ao redor dos primeiros molares inferiores. Decorrido os períodos de 07, 15 e 30 dias após a primeira injeção intraperitoneal (SS ou quimioterápicos) os animais foram submetidos à eutanásia pela administração de dose letal de thiopental (150mg/kg). As mandíbulas coletadas foram divididas em duas partes e processadas de acordo com as análises propostas. Na análise fotométrica foi avaliada a perda óssea alveolar na região de primeiro molar inferior. Para as análises por micro-CT foi avaliado a porcentagem do volume ósseo na região de furca do primeiro molar inferior. As hemimandíbulas contralaterais foram utilizadas para análises imunoistoquímicas dos biomarcadores na região de furca (RANKL, OPG, TRAP). Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$) em um programa de computador especializado (Bioestat 5.0). Nos animais que foram submetidos a PE, não houve diferença na POA, porém na análise por micro-CT o grupo PE-CIS apresentou menor PVO na região de furca quando comparado

com o grupo PE-SS aos 15 e 30 dias. Na análise imunoistoquímica, o grupo PE-CIS apresentou maior padrão de imunomarcção de células TRAP e RANKL quando comparado ao grupo PE-SS. Para OPG, todos os grupos apresentaram baixo padrão de imunomarcção em todos os períodos experimentais. Com relação aos animais sem a PE, não houveram diferenças nos resultados encontrados entre os grupos. Conclui-se que, dentro dos limites do presente estudo, apesar da CIS isoladamente não induzir alterações no tecido periodontal saudável, o quimioterápico agravou a progressão da PE, possivelmente por alteração na resposta inflamatória e exacerbação da atividade osteoclastogênica

Palavras chaves: Periodontite experimental; Quimioterapia; Modelo animal.

FERNANDES, GL. **Immunohistochemical analysis in Alveolar Bone Tissue of the Influence of Cisplatin on Experimental Periodontitis in Rats.** Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba: UNESP - Univ. Estadual Paulista; 2018.

Abstract

The aim of this animal study evaluate via photometric analysis by micro-computed tomography (Micro-CT) and analysis of immunohistochemically study, the influence of chemotherapeutic drug Cisplatin (CIS) on metabolism of alveolar bone in the evolution of experimental periodontitis (EP) in rats. In the present study, 120 male rats divided following a table generated by a computer program into 4 groups, with 30 animals each. **NEP- SS group**, also called the sham group. The animals in this group received two intraperitoneal injections with 48-hour interval between them of 0.5 ml of saline solution 0.9 % (SS). These animals were not induced to EP. **EP - SS group**: the animals in this group received two intraperitoneal injections with 48-hour interval between them of 0.5 ml of SS. Soon after the first injection, PE was induced in the lower first right and left molars. **NEP - CIS group**: the animals in this group received two intraperitoneal injections with 48- hour interval between them of 5 mg/kg and 2.5 mg/kg of cisplatin (CIS) respectively. These animals were not induced to EP. **EP - CIS group**: the animals in this group received two intraperitoneal injections with 48-hour interval between them of 5 mg/kg and 2.5 mg/kg CIS respectively. Soon after the first injection, PE was induced in the lower first right and left molars. EP was induced by the placement of a number 24 cotton thread around the lower first molars. After of 07, 15 and 30 days after the first intraperitoneal injection (SS or chemotherapy) animals were euthanized using an overdose of thiopental (150mg/kg). The mandibles collected were divided into two parts and processed according each analyzes. For the photometric analysis was evaluated bone loss (EBL) in the first molar region. For analysis by Micro-CT was evaluated the percentage of bone volume (PBV) in the first molar furcation area. The contralateral mandibles were used for immunohistochemical analyzes of biomarkers in the furcation area (RANKL, OPG, TRAP). Quantitative data was analyzed statistically ($p < 0.05$) in a specialized computer program (Bioestat 5.0) In animals were submitted to EP there was not difference in the EBL. However, in the analysis by Micro-CT, the group EP-CIS presented lower PBV in furcation area when compared to the group EP-SS in the 15 and 30 days. Immunohistochemical analyzes, the group EP-CIS presented higher standard of cell immunostaining TRAP and RANKL when compared to the group EP-SS. For

OPG, all groups presented low immunostaining standard in all experimental periods. In relation to animals without EP, there were not differences in the results found between the groups. It is concluded that, within the limits of the present study, although CIS alone not induce changes in healthy periodontal tissue, chemotherapy worsened the progression of EP, possibly by altered inflammatory response and exacerbation of osteoclastogenic activity.

Keywords: Experimental Periodontite; Chemotherapy; Alveolar bone loss; Animal model.

Listas

Anexo A

Certificado de aprovação do CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais para o projeto de pesquisa intitulado “Análise imunoistoquímica no tecido ósseo alveolar da influência da cisplatina na periodontite experimental em ratos.”

Lista de Abreviaturas e Siglas

µm - Micrômetros;

5-FU - 5 Fluorouracil;

ANOVA – Análise de Variância;

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais;

CIS - Cisplatina;

CNPQ – Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico;

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

DMT - Dose máxima tolerável;

DNA - Ácido desoxirribonucleico;

DP- Doença Periodontal;

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo;

HE - Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e Eosina;

IL – Interleucina;

INCA – Instituto Nacional de Câncer;

mg - Miligramas;

mg/Kg - Miligramas por quilogramas;

Micro-CT – Microtomografia computadorizada;

mm - Milímetros;

OMS - Organização Mundial da Saúde;

OPG – Osteoprotegerina;

PE – Periodontite Experimental;

POA – Perda óssea alveolar;

PVO – Porcentagem de volume ósseo;

RANKL – Receptor ativador de NF-Kappa B ligante;

RNA - Ácido ribonucleico;

ROI – Região tridimensional de interesse;

SPE – Sem Periodontite Experimental;

SS - Solução de cloreto de sódio 0,9%;

TNF α – Fator de Necrose Tumoral Alfa;

TRAP – Fosfatase Ácida Tártaro Resistente;

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Sumário

1. Introdução	24
2. Objetivo	28
3. Material e Métodos	29
<i>Animais</i>	29
<i>Sedação e Anestesia</i>	29
<i>Protocolo Medicamentoso – Tratamento quimioterápico</i>	29
<i>Grupos Experimentais</i>	30
<i>Indução da periodontite experimental</i>	31
<i>Períodos Experimentais</i>	31
<i>Delineamento da Pesquisa</i>	32
<i>Análise fotométrica</i>	32
<i>Análise por Microtomografia Computadorizada</i>	33
<i>Processamento e análise imunoistoquímica</i>	34
<i>Análise estatísticas dos dados</i>	34
4. Resultados	35
5. Discussão	41
6. Conclusão	44
7. Referências	45

1. Introdução

Proporcionar qualidade de vida aos pacientes submetidos ao tratamento oncológico é uma busca constante, principalmente após o aumento da expectativa de vida obtida pelas novas terapias de combate ao câncer. Assim sendo, a saúde e manutenção dos dentes na cavidade oral é de suma importância para a qualidade de vida do paciente, durante e após o tratamento oncológico. Por outro lado, a OMS estima que o aparecimento anual de novos casos de câncer irá aumentar de 14 milhões em 2012 para 22 milhões dentro das próximas duas décadas (WHO 2014). O tratamento convencional para o câncer é baseado, atualmente, em três importantes modalidades: cirurgia, radioterapia e quimioterapia citotóxica. A retirada cirúrgica de um tumor primário é um tratamento necessário e efetivo para um grande número de tipos de câncer (Shurin, 2009). A maioria dos casos de quimioterapia para o tratamento do câncer se baseia na administração de uma dose máxima tolerável (DMT) 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 acumulada para os tecidos normais, incluindo as células do sistema imune. Assim, a quimioterapia convencional está comumente associada com uma variedade de efeitos colaterais, inclusive mielossupressão e diminuição da viabilidade e número de células dendríticas (Saltz & Kemeny, 1996; Half & Arber, 2009).

A cavidade oral é alvo frequente dos efeitos tóxicos dos agentes antineoplásicos por apresentar tecidos com rápida divisão celular. As drogas usadas não apresentam ação específica sobre as células cancerosas e, por não as diferenciar das células normais, em rápida divisão, são lesivas a ambas (McGuire, 2002). Além do mais, em pacientes submetidos à quimioterapia, são comumente observadas mucosite e hipofunção das glândulas salivares, sendo estas as manifestações adversas as quais interferem significativamente na qualidade de vida do indivíduo (Kim et al., 2012).

Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, a CIS é uma droga amplamente utilizada durante a quimioterapia (Vermorken et al., 2014; Lorch et al., 2011; Taylor et al., 1994), sendo também utilizada durante a radioterapia em razão do seu potencial radiosensibilizador (Dewit, 1987). A Cis é um composto com ampla atividade antineoplásica, sendo utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, dentre os quais os de testículo, pulmão, ovário, esôfago, cabeça e pescoço, mama e o carcinoma de bexiga (Wang & Lippard, 2005; Pang et al., 2007; Zhang et al., 2009). A molécula de cisplatina possui um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia e torna-se ativa pela reação

de moléculas de água com os íons cloreto, reagindo, assim, com biomoléculas como DNA, RNA proteínas e membranas fosfolipídicas (Wang & Lippard, 2005; Cho et al., 2008). Sabe-se que a atividade antitumoral da cisplatina é resultado da sua interação com o DNA. Esta, 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). Drogas que afetam a síntese de DNA exibem efeitos adversos na cavidade oral mais pronunciados em razão da rápida renovação do epitélio oral (Naidu et al., 2004). 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.

Da mesma maneira, o tecido ósseo alveolar pode ter sua estrutura comprometida pelo uso da Cis. 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). Stine et al. 2014 observaram uma menor formação óssea em áreas de defeito ósseo, sugerindo que a toxicidade causada pela Cis afeta vias que interferem na formação óssea. Ehrhart et al. 2002 observaram menor porcentagem de osso mineralizado e menor quantidade de osteoblastos recobrando o tecido ósseo em defeitos ósseos. Young et al. 1997 observaram que em animais tratados com Cis houve redução significativa na formação de osso extracortical periprotético assim como menor atividade de reabsorção e neoformação óssea e Barth et al.

1986 observaram uma diminuição significativa no crescimento ósseo ao redor de implante de titânio. Porém a via pela qual a Cis afeta a formação óssea não está totalmente elucidada.

As DP são doenças inflamatórias nas quais fatores etiológicos microbianos induzem uma série de respostas no hospedeiro que mediam os eventos inflamatórios. Em indivíduos susceptíveis, uma alteração nas respostas imune e inflamatória leva à inflamação crônica, destruição tecidual e doença (Cekici et al., 2014). A patogênese da doença periodontal pode ser afetada por uma variedade de drogas, principalmente aquelas que interagem com a resposta imune e inflamatória (Alani & Seymour, 2014). Porém algumas medicações podem influenciar na progressão da DP (Nassar et al., 2009). Poucos são os estudos em humanos que avaliaram os efeitos adversos dos quimioterápicos antineoplásicos nos tecidos periodontais (Jensen et al., 2008; Mazzeo et al., 2009; Djuric et al., 2010; Ogawa et al., 2012). Estes estudos clínicos demonstraram que a quimioterapia provocou aumento do índice gengival (Jensen et al., 2008; Djuric et al., 2010), alterações na resposta inflamatória gengival, aumento na profundidade de sondagem (Mazzeo et al., 2009; Djuric et al., 2010) e aumento dos índices de placa e sangramento (Djuric et al., 2010). Ogawa et al., 2012 constataram que a periodontite ocorreu com maior frequência em pacientes que receberam tratamento com drogas quimioterápicas. Porém em se tratando de estudos clínicos, os dados são inconclusivos com relação à influência e mecanismo de ação das drogas quimioterápicas no periodonto.

Por outro lado, estudos em animais que avaliem a influência de drogas utilizadas na quimioterapia sobre os tecidos periodontais são raros, havendo apenas um estudo (Garcia et al., 2013). Garcia 2013, 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 (80 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. A autora observou 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.

Com relação à periodontite experimental, diferentes modelos animais têm sido propostos e utilizados para investigar a interação bactéria-hospedeiro e para avaliar a patogênese da periodontite (Kesavalu et al., 2007; Graves et al., 2008; Polak et al., 2012; Graves et al., 2012; de Molon et al., 2013). Modelos de animais de doença periodontal tem contribuído para o novo

conhecimento da etiopatogenia da doença periodontal. Uma importante característica na escolha de modelos experimentais utilizados para doenças infecciosas humanas é a habilidade para simular um processo infeccioso similar ao que é observado em humanos, mimetizando a patogênese da doença natural (Genco et al., 1998). Modelos animais permitem estudos da etiologia, o papel específico dos fatores de virulência, o efeito celular e mediadores químicos celulares na resposta tecidual, mecanismo de colonização e o papel de outras infecções (Genco et al., 2008). Estudos longitudinais em humanos apresentam alguma limitação relacionada ao mecanismo da doença devido às muitas variações que são de difícil controle entre os pacientes, como progressão, suscetibilidade, fatores ambientais e duração da doença (Dumitrescu et al., 2004). Assim, estudos em humanos são limitados pela dificuldade de elucidar a patogênese da doença periodontal (de Molon et al., 2014). Pela semelhança do homem com os primatas, estes representam o melhor modelo para estudo em animais. No entanto, o rato é o animal mais frequentemente utilizado em estudos de periodontite experimental, pois, comparado ao primata, ele é de fácil manipulação, de custo reduzido e apresenta resposta biológica com grande semelhança à do homem (Listgarten et al., 1975; Klausen, 1991), além do mais, é o modelo aceito pelo comitê de ética em experimentação animal.

Para a indução da periodontite experimental em roedores, a ligadura é o método mais largamente utilizado na pesquisa periodontal (de Molon et al., 2014). Em ratos, a perda óssea alveolar ocorre de maneira previsível após 7 dias (Rovin et al., 1966; Bezerra et al., 2007; Kuhr et al., 2004; de Almeida et al., 2007). Este modelo é dependente da presença de bactérias, pois em modelos em ratos germ-free, a ligadura não induziu significativo colapso periodontal (Rovin et al., 1966). Estudos desenvolvidos em nosso laboratório tem demonstrado este modelo efetivo para avaliação da evolução da PE (de Almeida et al., 2008a,b) e também no tratamento da PE por diferentes métodos (Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2013; Theodoro et al., 2014). O mesmo observado por outros colegas que utilizam metodologias semelhantes (Nassar et al., 2014; Furlaneto et al., 2014; Pavone et al., 2014).

2. Objetivo

Constitui propósito do presente estudo em animais, avaliar via análises fotométrica, micro-CT e imunohistoquímica, a influência do quimioterápico CIS, tanto sobre os tecidos periodontais normais, quanto sobre os tecidos periodontais acometidos por PE.

4. Material e Métodos

Animais

O presente projeto foi enviado e aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal, da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” UNESP – Câmpus de Araçatuba. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA), e após a sua aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). **(Protocolo nº00542-2014) (Anexo A).**

No presente estudo foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 260g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e posteriormente mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP, sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de 22 ± 2 °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 e água *ad libitum*. Os animais se apresentaram saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios.

Sedação e Anestesia

Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70mg/kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – ZoetisFlorham Park, NJ – USA) e 6mg/kg Cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil.), aplicados intramuscular no biceps *femoris* da pata direita. Nos casos em que não se obteve o efeito adequado do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

Protocolo Medicamentoso – Tratamento quimioterápico

A administração de Solução Salina a 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) ou cisplatina (Fauldcispla, 10 mg/10 ml, Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de 48 horas entre elas. Para a cisplatina, a primeira dose foi de 5 mg/kg (havelka et AL.,2007) e a segunda dose 2,5 mg/kg. A dose constitui-se em uma adaptação para o rato, do protocolo empregado para

terapia oncológica em humanos o qual considera a superfície corpórea para determinação da dose (Dubois & Dubois,1916; Nakasato et al,2012).



Figura 1: Administração do Quimioterápico.
Foto demonstrativa da aplicação da medicação por via intraperitoneal.

Grupos Experimentais

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

Grupo SPE-SS: também chamado de grupo sham. Animais sem periodontite experimental induzida (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%, aplicada.

Grupo PE-SS: Animais com PE. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneal 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 periodontite experimental no primeiro molar inferior direito e esquerdo.

Grupo SPE-CIS: Animais sem PE. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções intraperitoneal 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 intraperitoneal 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 periodontite experimental no primeiro molar inferior direito e esquerdo.

Indução da Periodontite Experimental

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 n°.24; Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil.) ao redor dos primeiros molares inferiores, distribuído randomicamente entre o lado direito e esquerdo, no nível do sulco gengival sendo mantido nesta posição por meio de nó cirúrgico (Fig. 2).

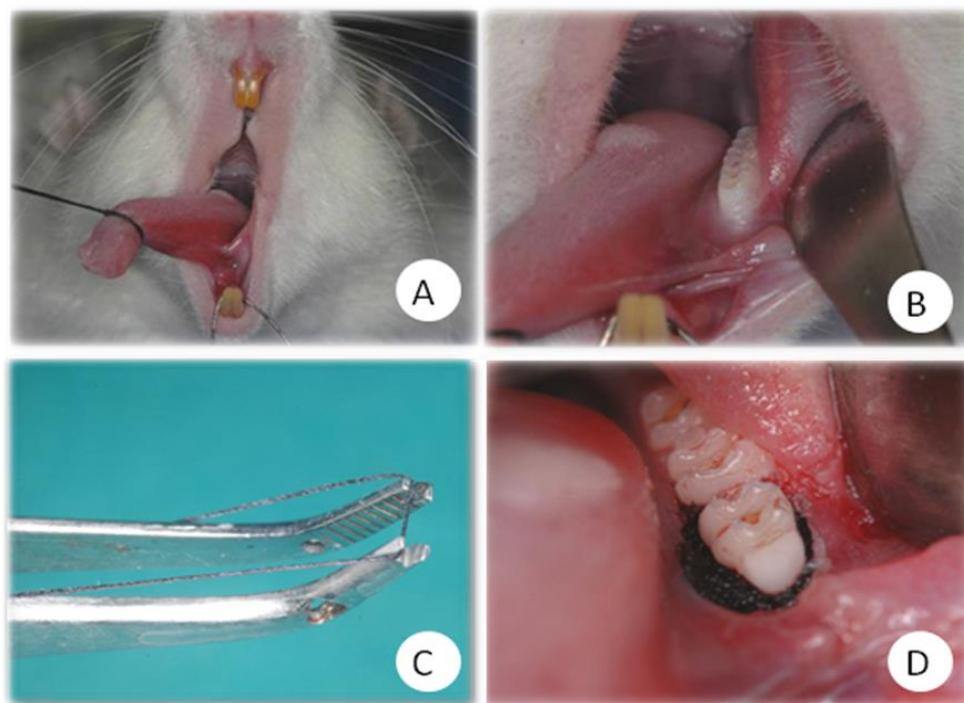


Figura 2. Procedimentos de indução da periodontite.

(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.

Períodos Experimentais

Dez animais de cada grupo experimental (SPE-SS; PE-SS; SPE-CIS; PE-CIS) foram eutanasiados aos 2, 7, 15 e 30 dias após a indução da periodontite experimental. A eutanásia foi realizada por meio de dose letal de anestésico (Thiopental 150 mg/Kg) e a mandíbula de cada

animal foi removida, separada em duas partes, e acondicionadas em frascos contendo solução de formaldeído tamponado a 4% por um período mínimo de 48 horas.

Delineamento da Pesquisa



Análise Fotométrica

Os espécimes utilizados para análise fotométrica foram os mesmos utilizados para análise de microtomografia computadorizada. Com uma simples adaptação da metodologia previamente descrita (Tatakis & Guglielmoni 2000) foi utilizada para coleta dos dados fotométricos. Os espécimes foram embebidos em solução de hipoclorito de sódio à 2,5% seguido pelo peróxido de hidrogênio para remoção da porção de tecido mole. Após secagem dos espécimes estes foram corados com solução de azul de metileno à 1%. Esta coloração facilitou a identificação da junção cimento esmalte. Os espécimes corados foram apropriadamente afixados em mesa estereoscópica e imagens digitais foram obtidas por máquina fotográfica digita (D70 - Nikon Corporation, Japão.) das porções vestibular e lingual do primeiro molar inferior. Para calibração das medidas digitais, no momento da captura das imagens digitais foi adaptada uma régua calibradora para servir de referência para as mensurações das imagens digitais. Com o auxílio do software *Image J 1.49V* foi calculada a área (mm²) de perda óssea ao redor do primeiro molar inferior em cada grupo e período experimental. Em cada espécime foi coletada 3 medidas em cada superfície analisada a qual realizada em dias diferentes com intervalo de 1 dia entre elas. As mensurações foram realizadas por um único examinador treinado, calibrado e blindado a que grupo pertence às imagens.

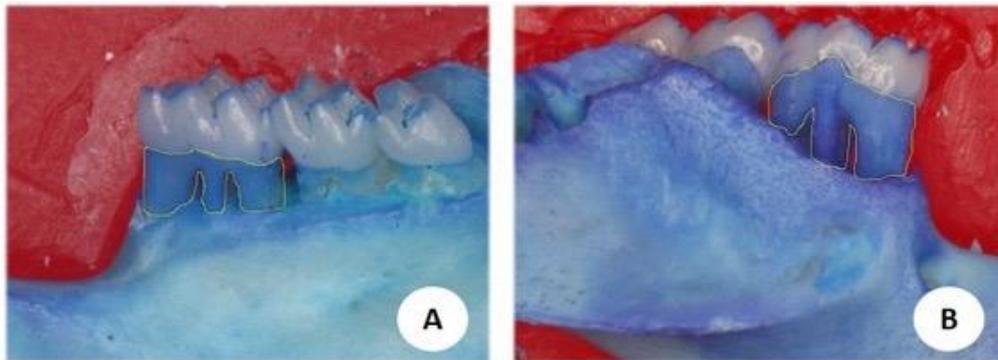
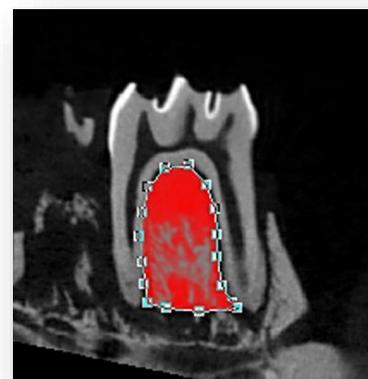


Fig. 3 – Figura representativa da metodologia adotada para análise fotométrica da POA.
 (A) Análise da perda óssea da porção vestibular; (B) Análise da perda óssea da porção palatina.

Análise por micro tomografia computadorizada da porcentagem do volume ósseo

Os espécimes, que foram utilizados para análise microtomográfica foram acondicionados em álcool a 70% e escaneados por varredura de feixe de raio-x em um sistema de radiografia tridimensional utilizando a microtomografia digital computadorizada (micro-CT). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) com cortes de 18µm. As imagens geradas foram sequencialmente reconstruídas, reorientadas espacialmente e analisadas usando um software específico (NRecon/DataViewer/CTAN;Skyscan) para quantificar a porcentagem de volume ósseo na região da furca (Park et al., 2007). Em cada imagem, uma região tridimensional de interesse “ROI” foi padronizada adaptativamente de acordo com os seguintes critérios:

- **Limite apical:** ápice das raízes mesial e distal do primeiro molar;
- **Limite coronal:** topo da furca do primeiro molar;
- **Limite posterior:** face mesial da raiz distal do primeiro molar;
- **Limite anterior:** face distal da raiz mesial do primeiro molar.



A análise da porcentagem do volume ósseo foi calculada para a detecção de tecido mineralizado dentro da região de interesse (ROI).

Processamento e Análise Imunoistoquímica

Os espécimes que foram utilizados para as análises imunoistoquímica foram as hemimandíbulas contralaterais das selecionadas para análise por micro-CT. Após fixação por um período mínimo de 48 horas das peças foram lavadas em água corrente por 12 horas para remoção do formol 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 aparadas, lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Durante a inclusão, as peças foram posicionadas com a face vestibular paralela ao plano de corte. Os cortes foram realizados no sentido mésio-distal, com o cuidado de sempre estarem no longo eixo do dente envolvendo as raízes mesial e distal.

Através dos cortes seriados de 4 µm de espessura foi realizado as análises imunoistoquímicas da área de furca direcionadas para os seguintes biomarcadores: 1) fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase), um biomarcador de osteoclastos; 2) ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL, receptor activator of nuclear factor- k B), um regulador positivo da osteoclastogênese e da atividade do osteoclasto; 3) osteoprotegerina (OPG); um regulador negativo da osteoclastogênese e da atividade do osteoclasto. A seleção das secções imunoistoquímicas foi realizada por um examinador treinado e cego aos grupos experimentais. Foram selecionadas 3 secções histológicas equidistantes da área de furca, com aumento de 400x. Foram consideradas imunomarcações, as células que apresentaram positividade da marcação, que foi considerada células positivas as quais exibiram coloração acastanhada no citoplasma e matriz extracelular (TRAP, RANKL, OPG), independente da intensidade. A imunomarcação foi mensurada via análise semi quantitativa da imunomarcação no ligamento periodontal e no osso alveolar da área de furca.

Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa Bioestat 5.0(Sociedade Civil de Mamirauá, Belem, PA, Brazil). Os dados foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, em seguida pelo teste de variância (ANOVA) a um critério e o pós teste de Tukey. Os testes foram aplicados com nível de significância de 5%.

5. Resultados

Análise Fotométrica

Os resultados estão apresentados no Gráfico 1. Na análise intergrupos, os grupos PE-SS e PE-CIS apresentaram menor POA quando comparado aos grupos SPE-SS e SPE-CIS em todos os períodos experimentais ($p \leq 0,05$).

1. Gráfico mostrando média e desvio padrão ($M \pm D$) da POA (mm^2) nos diferentes grupos e períodos. Símbolo: *diferença com os grupos SPE-SS e SPE-CIS ($p < 0,05$). ANOVA e teste Tukey.

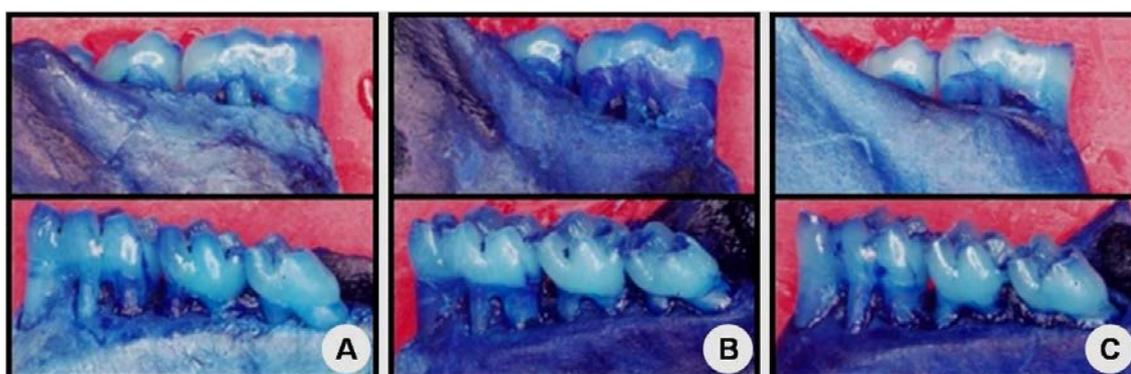
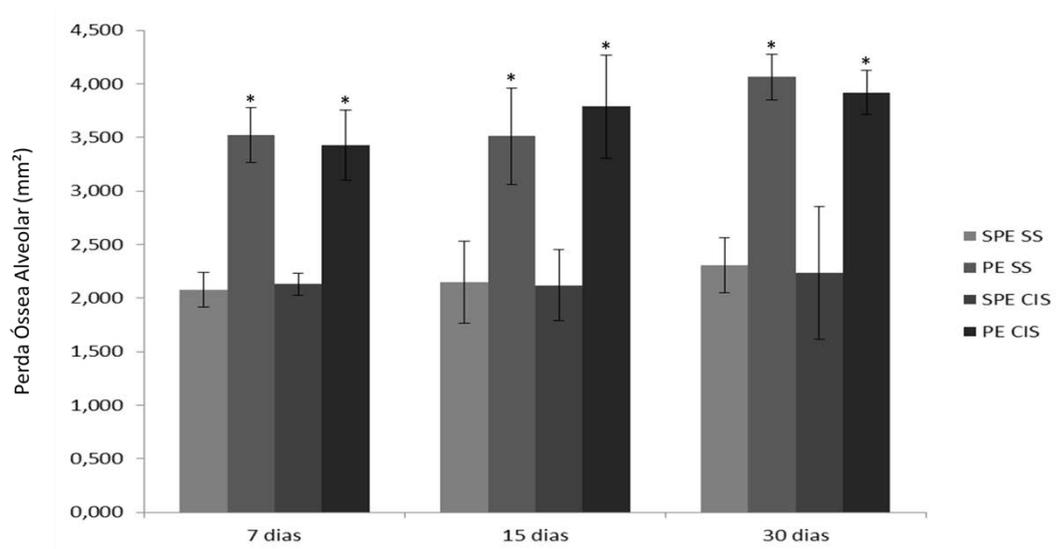


Figura 3.(A) Grupo PE-CIS 7 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo PE-CIS 15 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo PE-CIS 30 dias, imagens vestibular e lingual.

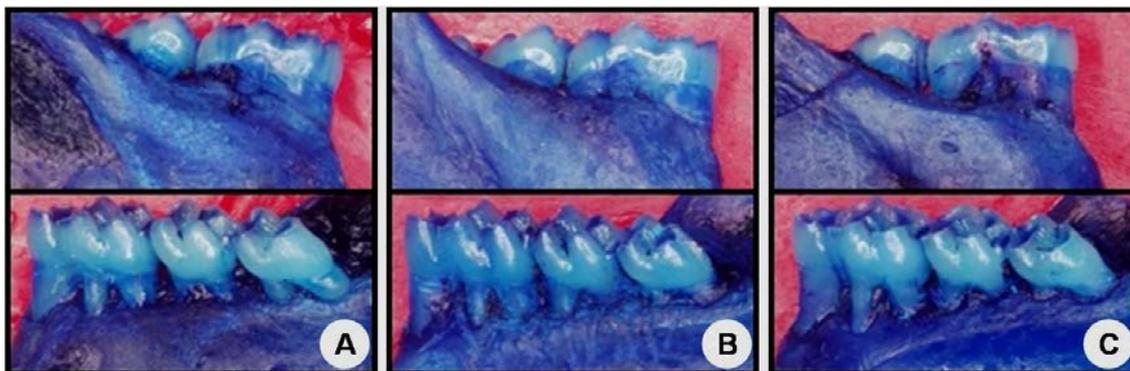


Figura 4. (A) Grupo PE-SS 7 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo PE-SS 15 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo PE-SS 30 dias, imagens vestibular e lingual.

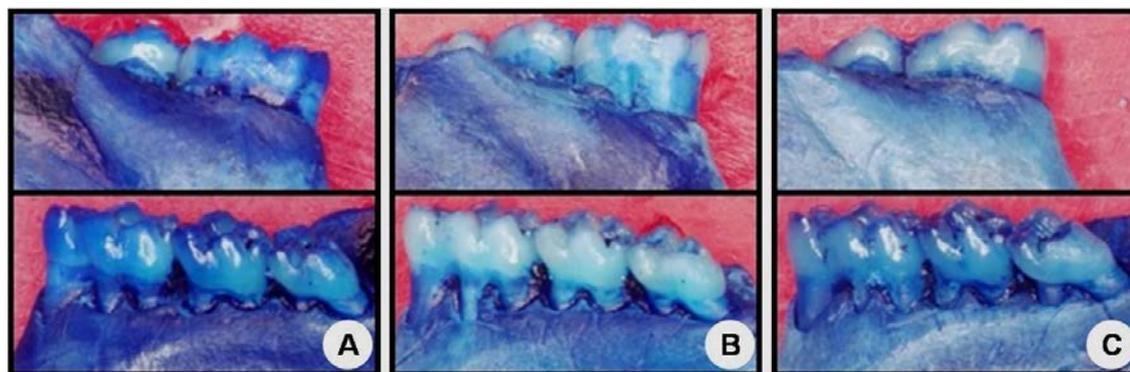


Figura 5. (A) Grupo SPE-CIS 7 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo SPE-CIS 15 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo SPE-CIS 30 dias, imagens vestibular e lingual.

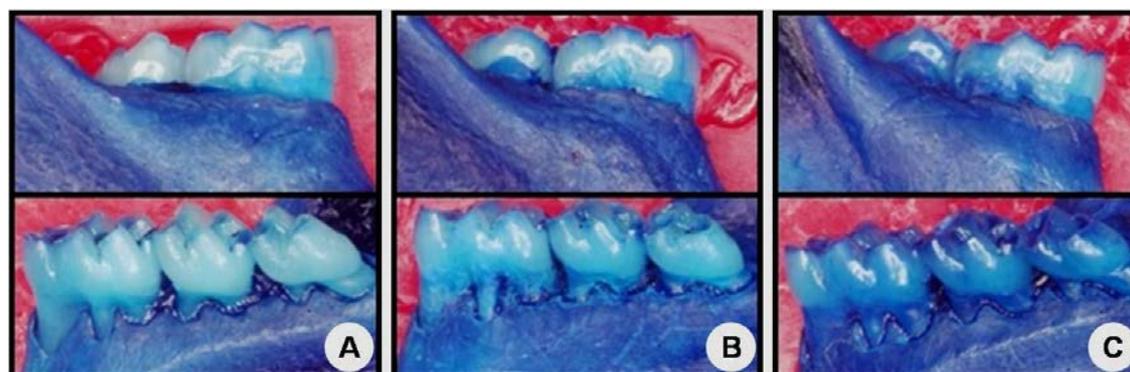


Figura 6. (A) Grupo SPE-SS 7 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo SPE-SS 15 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo SPE-SS 30 dias, imagens vestibular e lingual.

Resultado da análise de microtomografia computadorizada

Os resultados da microtomografia computadorizada estão representados na tabela 1. Na análise intergrupo, os grupos PE-SS e PE-CIS mostraram menor Porcentagem de Volume Ósseo (PVO) quando comparados aos grupos SPE-SS e SPE-CIS em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$). O grupo PE-CIS mostrou menor PVO quando comparado ao grupo PE-SS aos 15 e 30 dias ($p < 0,01$). Na análise intragrupo, o grupo PE-CIS aos 7 dias mostrou menor PVO quando comparado aos 15 e 30 dias ($p < 0,01$)

Tabela 1: Média e Desvio Padrão da análise por micro-CT da porcentagem do volume ósseo na área de furca do primeiro molar inferior.

	7 dias	15 dias	30 dias
SPE SS	75,6 ± 6,8	70,93 ± 6,95	76,77 ± 1,82
PE SS	65,15 ± 7,19*	63,21 ± 2,25*#	72,22 ± 4,17*#
SPE CIS	76,09 ± 5,48	74,11 ± 3,91	78,27 ± 3,94
PE CIS	46,79 ± 9,15*	57,03 ± 7,00*#&	63,59 ± 1,12*#&

*diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS e SPE-CIS em todos os períodos ($p < 0,01$).

diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-CIS nos respectivos períodos ($p < 0,01$).

& diferença estatisticamente significativa com o período de 7 dias no mesmo grupo ($p < 0,01$).

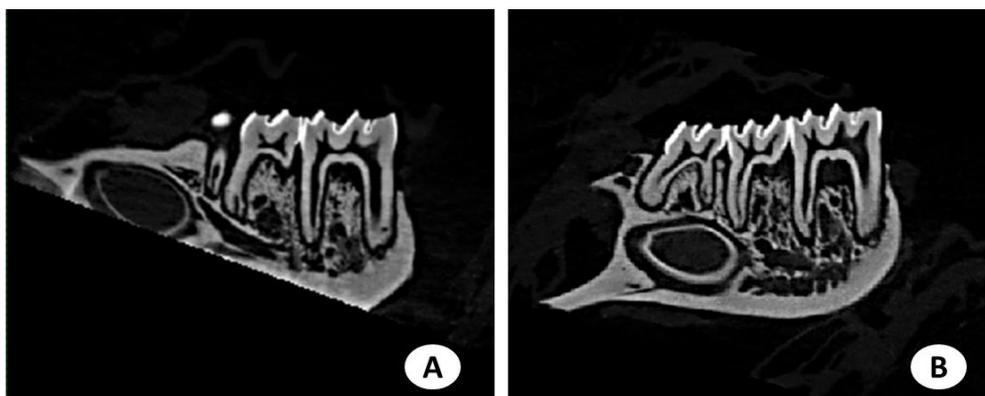


Figura 7. A: imagem representativa microtomográfica do grupo PE-SS 7 dias. B: imagem representativa microtomográfica do grupo PE-CIS 7 dias.

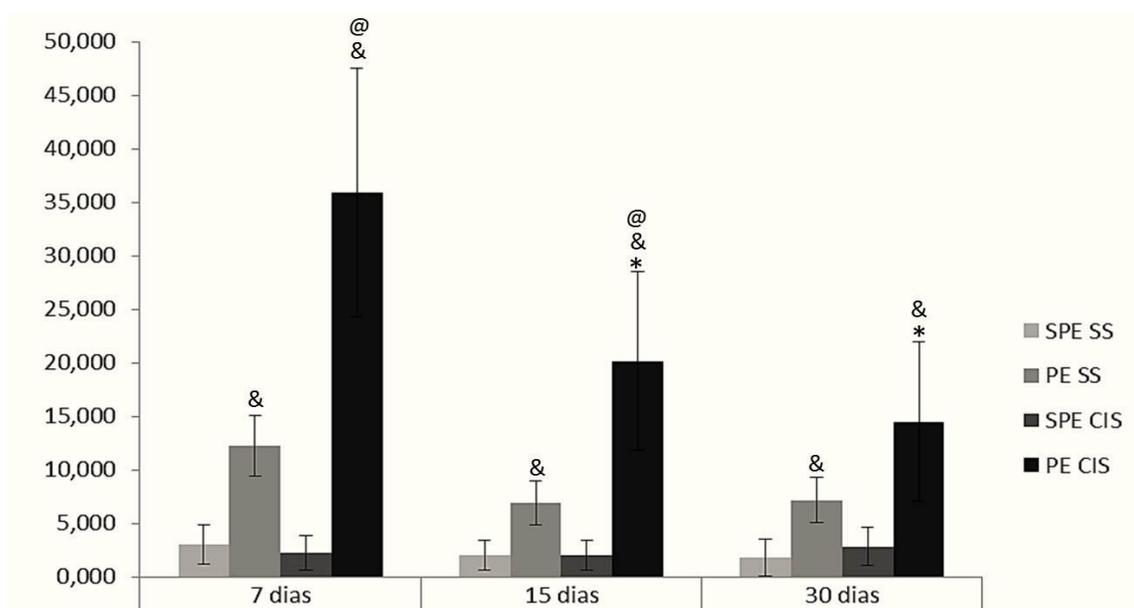
Resultado da análise Imunoistoquímica

O resultado para células TRAP imuno reativas estão representados no gráfico 2. Na análise intragrupo, o grupo PE-CIS apresentou maior quantidade de células TRAP aos 7 dias quando comparados aos 15 e 30 dias ($p < 0,01$). Na análise intergrupos, os grupos PE-SS e PE-CIS apresentaram maior quantidade de células TRAP quando comparados aos grupos SPE-SS e SPE-CIS em todos os períodos experimentais ($p < 0,01$). O grupo PE-CIS apresentou maior quantidade de células TRAP quando comparado ao grupo PE-SS aos 7 e 15 dias ($p < 0,05$).

Para RANKL, no decorrer dos períodos de 7, 15 e 30 dias, o grupo PE-CIS apresentou um padrão de imunomarcção que foi de extremamente alto a alto enquanto o grupo PE-SS apresentou um padrão de imunomarcção que foi de alto à moderado. Os Grupos SPE-SS e SPE-CIS apresentaram um baixo padrão de imunomarcção em todos os períodos experimentais.

Para OPG os grupos SPE-SS, SPE-CIS, PE-SS e PE-CIS apresentaram baixo padrão de imunomarcção em todos os períodos experimentais.

2. Gráfico mostrando média e desvio padrão ($M \pm D$) das células TRAP nos diferentes grupos e períodos. Símbolos: *Diferença estatisticamente significativa no mesmo grupo com 7 dias; &Diferença estatisticamente significativa com os grupos SPE-SS e SPE-CIS nos mesmos períodos; @Diferença estatisticamente significativa com o grupo PE-SS no mesmo período ($p < 0,05$). ANOVA e teste Tukey.



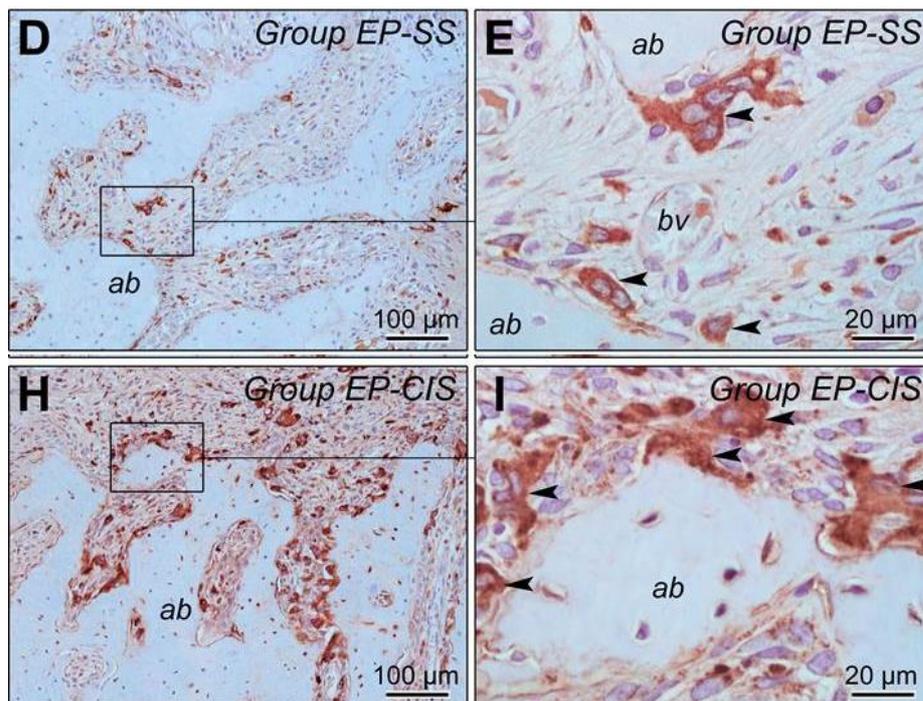


Figura 8. Padrão de imunomarcção para TRAP no osso alveolar da região de furca do primeiro molar inferior de ratos. (A-I) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção de células multinucleadas TRAP-positivas no osso alveolar aos 7 dias em PE-SS (D-E), PE-CIS (H-I). Abreviações e símbolos: ab, osso alveolar; bv, vasos sanguíneos; pdl, ligamento periodontal; setas pretas, células TRAP-positivas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: D, H, 200X; E, I, 1000X. Barras de escala: D, H, 100 µm; E, I, 20 µm.

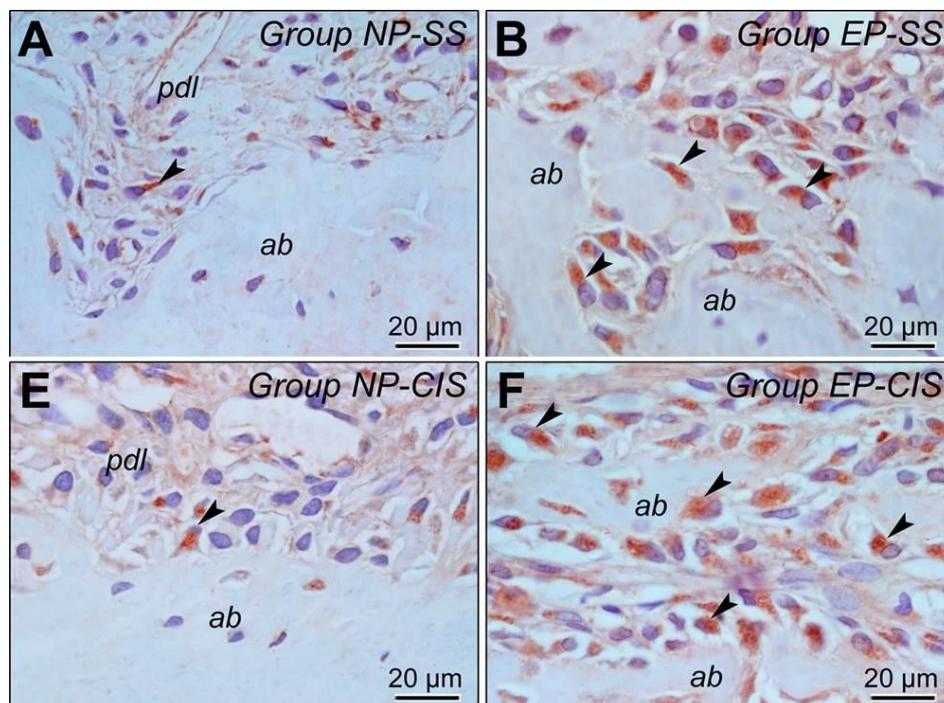


Figura 9. Padrão de imunomarcção para RANKL no osso alveolar da região de furca do primeiro molar inferior de ratos. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção de células nucleadas RANKL-positivas no osso alveolar aos 7 dias em SPE-SS (A), PE-SS (B), SPE-CIS (E), PE-CIS (F). Abreviações e símbolos: ab, osso alveolar; pdl, ligamento periodontal; setas pretas, células RANKL-positivas. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 µm.

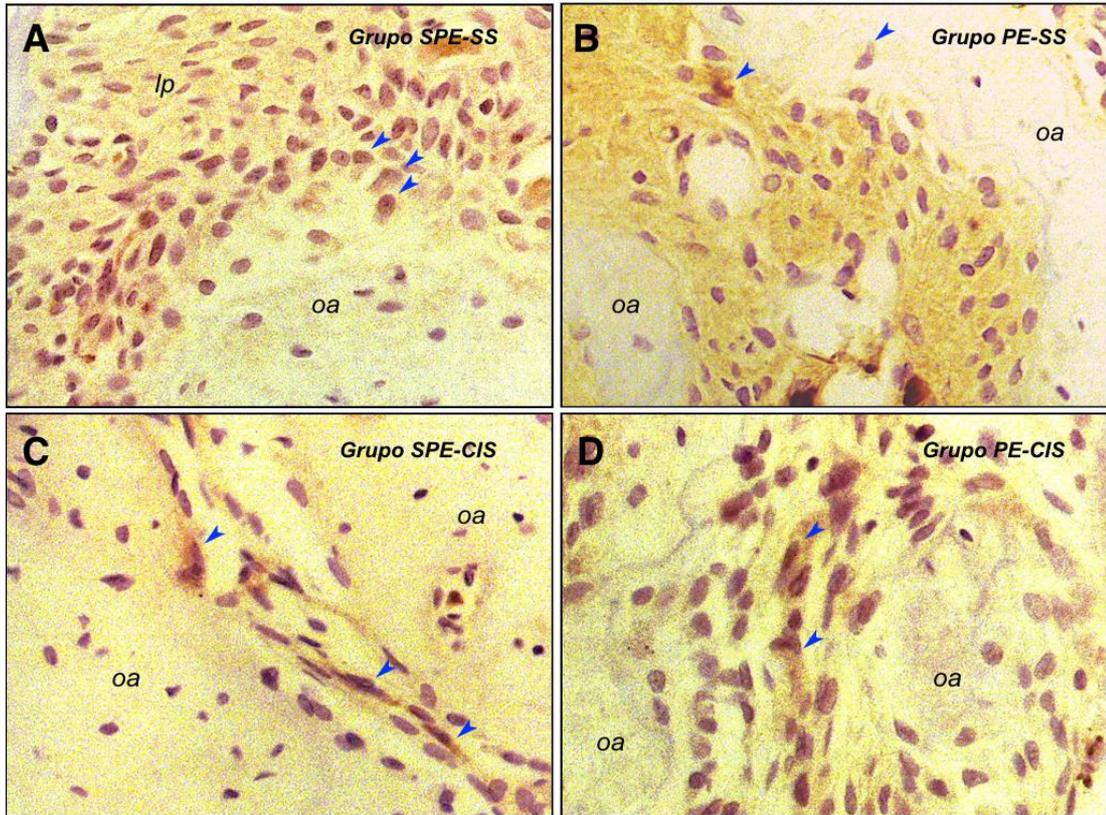


Figura 10: Padrão de imunomarcção para OPG no osso alveolar da região de furca do primeiro molar inferior de ratos. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção de células OPG-positivas no osso alveolar aos 7 dias em SPE-SS (A), PE-SS (B), SPE-CIS (C), PE-CIS (D). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; lp, ligamento periodontal; setas azuis, células OPG-positivas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 400x.

6. Discussão

Este estudo avaliou, através das análises fotométrica, por Micro CT e imunoistoquímica, a influência da CIS tanto sobre os tecidos periodontais normais, quanto sobre os tecidos periodontais acometidos por PE induzida em ratos.

Sabe-se que a atividade antitumoral da CIS é resultado da sua interação com o DNA celular, inibindo processos celulares fundamentais que incluem replicação, transcrição, tradução e reparo de DNA (Wozniak et al., 2004; Cho et al., 2008), o que interfere principalmente em células com alto índice mitótico, como células cancerígenas (Arias, 2008). Porém, quimioterápicos que afetam a síntese de DNA exibem pronunciados efeitos adversos na cavidade oral, em razão da rápida renovação do epitélio oral (Naidu et al., 2004). 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 desfavorecer o processo de reparo, favorecer a penetração, e contaminação dos tecidos mais profundos.

No presente estudo, ao avaliar os animais que não foram submetidos a PE, nas análises fotométrica, microtomográfica e imunoistoquímica, não houveram diferenças nos resultados encontrados entre os animais do grupo SPE-CIS com os animais do grupo SPE-SS. Além disso, os animais do grupo PE-CIS não apresentaram alterações morfológicas e imunoistoquímicas no tecido ósseo. Isso indica que na ausência de doença periodontal, apenas a influência da CIS não foi capaz de causar alterações no periodonto de sustentação. Este resultado também foi encontrado por Garcia et al. 2014, em estudo que avaliou o efeito do quimioterápico 5-fluorouracil na PE em ratos e concluiu que o mesmo não foi capaz de produzir alterações no periodonto sem PE.

Por outro lado, ao compararmos os animais portadores de PE dos grupos PE-SS e PE-CIS com animais sem PE dos grupos SPE-SS e SPE-CIS, foi observado diferença estatisticamente significativa com maior POA ao redor do dente portador de PE no resultado fotométrico, menor PVO na região de furca do dente com PE no resultado microtomográfico e maior quantidade de células TRAP na região de furca do dente com PE, assim como maior expressão de RANKL e menor expressão de OPG quando comparado com os animais sem PE em todos os períodos experimentais. Esse resultado corrobora com os achados de Cochran (2008) onde a agressão bacteriana resulta na resposta imune-inflamatória causadora do colapso dos tecidos periodontais.

Com relação aos animais com PE, ao compararmos os grupos PE-SS e PE-CIS podemos observar que os animais que receberam CIS apresentaram maior severidade da PE. Na análise fotométrica da POA ao redor do primeiro molar inferior não houve diferença entre os grupos PE-SS e PE-CIS, porém na análise microtomográfica o grupo PE-CIS apresentou menor PVO na região de furca quando comparado com o grupo PE-SS aos 15 e 30 dias.

Os resultados imunoistoquímicos estão coerentes com os dados das análises anteriores, nos quais o grupo PE-CIS apresentou maior quantidade de células TRAP quando comparado ao grupo PE-SS aos 7 e 15 dias. Para RANKL o grupo PE-CIS apresentou um padrão de imunomarcacão que foi de extremamente alto à alto, enquanto o grupo PE-SS apresentou um padrão de imunomarcacão que foi de alto à moderado no decorrer dos períodos. Para OPG, todos os grupos apresentaram baixo padrão de imunomarcacão em todos os períodos experimentais. Segundo Stine et al., 2014, a CIS promove um efeito negativo sobre o processo de reparacão óssea em defeitos ósseos. Esse fato pode ser explicado pela capacidade do quimioterápico em 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), comprovados em estudos que analisaram a influência CIS sobre tecidos renais (Miller et al., 2010; Ozkok & Edelstein, 2014). Sabe-se que a resposta destrutiva do organismo está associada com um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos, e as IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, fator inibidor de leucemia, oncostatina M, TNF- α , podem induzir a reabsorcão óssea periodontal de duas formas, pela concentraçã das citocinas (devendo ser suficientes para ativar a reabsorcão óssea) e pela proximidade crítica em relaçã ao osso alveolar (Cochran, 2008; Kayal 2013; Dosseva-Panova et al., 2014).

Desta forma, de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, a influência da CIS na PE pode ter alterado a resposta inflamatória e agravado a atividade osteoclastogênica. Em um estudo em ratos, Zart et al. (1993) concluíram que a quimioterapia com cisplatina teve um efeito desfavorável sobre a cicatrizaçã óssea. Além disso, Monsell et al. (2013) concluíram que a quimioterapia usando adriamicina e cisplatina antes da distraçã osteogênese diminuiu o volume do osso regenerado, porém sem afetar a qualidade do calo formado num modelo de coelho.

Os resultados do presente estudo com o quimioterápico CIS estão de acordo com outro estudo realizado pelo grupo utilizando o quimioterápico 5-FU para avaliar a evoluçã e o tratamento da PE em ratos (Garcia et al., 2014). Neste estudo os autores observaram que os animais que receberam o quimioterápico 5-FU apresentaram menor porcentagem de osso na

furca, maior infiltrado inflamatório e maior padrão de imunomarcção para RANKL, evidenciando a influência do 5-FU na severidade da PE (Garcia et al., 2014). O mesmo resultado foi encontrado por Theodoro, 2016 onde os animais tratados com 5-FU portadores de PE apresentaram uma grande destruição e desorganização dos tecidos periodontais, apresentando piores resultados comparado ao grupo de animais apenas portadores de PE.

7. Conclusão

Conclui-se que, dentro dos limites do presente estudo, apesar da CIS isoladamente não induzir alterações no tecido periodontal saudável, o quimioterápico agravou a progressão da PE, possivelmente por alteração na resposta inflamatória e exacerbação da atividade osteoclastogênica

8. Referências

1. ALANI, A.; SEYMOUR, R. Systemic medication and the inflammatory cascade. **Periodontol 2000**, p. 198–210, 2014.
2. ARIAS, J.L. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. **Molecules** v. 13, p. 2340-2369, 2008.
3. 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, n. 2, p. 123-7, 1986
4. BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. Lowdose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res** v. 35, p. 613-616, 2002.
5. **Cancer**. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 24 de fevereiro 2015.
6. CEKICI, A.; KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000** v. 64, p. 57-80, 2014.
7. 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.
8. de ALMEIDA, J. M., THEODORO, L. M., BOSCO, A.F., NAGATA, M. J. H., OSHIIWA, M., GARCIA, V.G. Influence of photodynamic therapy on the development of ligatureinduced periodontitis in rats. **J Periodontol** v. 78, p. 566-575, 2007.
9. de ALMEIDA, J. M.; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J.; OSHIIWA, M.; GARCIA, V. G. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations **J Periodontol** v. 79, n. 6, p. 1081-1088, 2008a.
10. de ALMEIDA, J. M.; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J.; OSHIIWA, M.; GARCIA, V. G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **J Periodontol** v. 79, n. 6, p. 2156-2165, 2008b.
11. de MOLON, R.S.; de AVILA, E.D.; CIRELLI, J.A. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: A literature review. **J Investig Clin Dent** v. 4, p. 211-218, 2013.

12. de MOLON, R.S.; de AVILA, E.D.; BOAS NOGUEIRA, A.V.; CHAVES DE SOUZA, J.A.; AVILA-CAMPOS, M.J.; de ANDRADE, C.R.; CIRELLI, J.A. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **J Periodontol** v. 85, p. 465-477, 2014.
13. 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.
14. 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.
15. DUBOIS D, DUBOIS E.F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. **Arch. Intern. Med.** v. 17, p. 862, 1916.
16. DUMITRESCU, A.L.; ABD-EL-ALEEM, S.; MORALES-AZA, B.; DONALDSON, L.F. A model of periodontitis in the rat: Effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **J Clin Periodontol** v. 31, p. 596-603, 2004.
17. EHRHART, N.L.; 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, n. 5,p. 703-11,2002.
18. FERNANDES, L.A.; de ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO,A.F.; NAGATA, M.J.; MARTINS, T. M.; OKAMOTO,T.; GARCIA, V.G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **J Clin Periodontol** v.36, n.3, p. 219-228, 2009.
19. FURLANETO, F.A.; NUNES, N.L.; OLIVEIRA FILHO, I.L.; FROTA, N.P.; YAMAMOTO, K.O.; LISBOA, M.R.; ERVOLINO, E.; TABA, M. JR.; RÊGO, R.O.; MESSORA, M.R. Effects of Locally-administered Tiludronic Acid on Experimental Periodontitis in Rats. **J Periodontol** Feb 6, 2014. [Epub ahead of print]
20. GARCIA, V.G.; FERNANDES, L.A.; MACARINI, V.C.; de ALMEIDA, J.M.; MARTINS, T.M.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; CIRELLI, J.A.; THEODORO, L.H. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotinmodified rats. **J Clin Periodontol** v. 38, p. 1106-14, 2011.
21. 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, 2014. [Epub ahead of print]

22. GARCIA, V.G.; LONGO, M.; GUALBERTO JÚNIOR, E.C.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; ERVOLINO, E., THEODORO, L.H. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **J Periodontal Res**. Nov 9, 2013. doi: 10.1111/jre.12138. [Epub ahead of print]
23. GENCO, C.A.; VAN DYKE, T.; AMAR, S. Animal models for Porphyromonas gingivalis-mediated periodontal disease. **Trends Microbiol** v. 6, p. 444-449, 1998.
24. GENCO, R.J. Clinical innovations in managing inflammation and periodontal diseases: the workshop on inflammation and periodontal diseases. **J Periodontol**. v. 79(8 Suppl), p. 1609-11, 2008.
25. GRAVES, D.T.; FINE, D.; TENG, Y.T.; VAN DYKE, T.E.; HAJISHENGALLIS, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol** v. 35, p. 89-105, 2008.
26. GRAVES, D.T.; KANG, J.; ANDRIANKAJA, O.; WADA, K.; ROSSA, C. Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol** v. 15, p. 117-132, 2012.
27. GUCHELAAR, H.J.; VERMES, I.; KOOPMANS, R.P.; REUTELINGSPERGER, C.P.; HAANEN, C. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** v. 42, p. 77-83, 1998.
28. HALF, E; ALBER, N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. **Expert Opin Pharmacother** v. 10(2), p. 211-9, 2009
29. HAVELKA, A.M; BERNDTSSON, M ; OLOFSSON, M.H; SHOSHAN, M.C; LINDER, S. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? **Mini Rev Med Chem** v, 7(10), p. 1035-9, 2007.
30. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. INCA. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014 . Acesso em 24 de fevereiro 2015.
31. 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.

32. JOHNSON, J.H. Effects of local irritation and dextran and sulphat administration on the periodontium of the rat. **J Periodont Res** v.10, p.332-345, 1975.
33. KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res.** v. 478, p. 23–43, 2001.
34. KESAVALU, L, SATHISHKUMAR, S, BAKTHAVATCHALU, V, et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. **Infect Immun** v. 75, p. 1704-1712, 2007.
35. KIM, J.W.; CHA, Y.; KIM, S.J.; HAN, S.W.; OH, D.Y.; LEE, S.H.; KIM, D.W.; IM, S.A.; KIM, T. Y.; HEO, D.S.; BANG, Y.J. Association of oral mucositis with quality of life and symptom clusters in patients with solid tumors receiving chemotherapy. **Supportive Care in Cancer** v. 20, p. 395-403, 2012.
36. KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol**, v. 62, n.1, p. 59-73, 1991.
37. KNOX, J.J.; PUODZIUNAS, A.L.V.; FELD, R. Chemotherapy-induced oral mucositis. Prevention and management. **Drugs Aging.** v. 14, p. 257-67, 2000.
38. KÖBERLE, B.; TOMICIC, M.T.; USANOVA, S.; KAINA, B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. **Biochim Biophys Acta.** In press, 2010.
39. KUHR, A.; POPA-WAGNER, A.; SCHMOLL, H.; SCHWAHN, C.; KOCHER, T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res** v. 39, p. 101-106, 2004.
40. LISTGARTEN, M.A. Similarity of relationships in the gingiva of rats and man. **J Periodontol** v.46, p.687-80, 1975.
41. 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.
42. 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.
43. McGUIRE, D.B. Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than muscositis and mouthwash. **Cancer Pract.** v. 10, p. 179-91, 2002.

44. 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.
45. NAKASATO, T.; IZUMISAWA, M.; AKAHANE, A.; KIKUCHI, K.; EHARA, S.; SHOJI, S.; KOGI, S.; MIZUKI, H.; SUGIYAMA, Y. Combined intra-arterial infusion and systemic chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. **Jpn J Radiol.** v. 30, p. 752-761, 2012.
46. NASSAR, P.O.; NASSAR, C.A.; GUIMARÃES, M.R.; AQUINO, S.G.; ANDIA, D.C.; MUSCARA, M.N.; SPOLIDORIO, D.M.; ROSSA, C.JR.; SPOLIDORIO, L.C. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research** v. 44, p. 479-488, 2009.
47. NASSAR, C.A.; BATTISTETTI, G.D.; NAHSAN, F.P.; OLEGÁRIO, J.; MARCONATO, J.; MARIN, C.F.; FACCIONI, D.M.; DA COSTA, K.F.; KOTTWITZ, L.B.; NASSAR, P.O. Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimental periodontitis--an animal study. **J Int Acad Periodontol.** v. 16, p. 2-7, 2014.
48. OGAWA, K.; UENO, T.; KATO, K.; NISHITANI, H.; AKIYOSHI, K.; IWASA, S.; NAKAJIMA, T.E.; HAMAGUCHI, T.; YAMADA, Y.; HOSOKAWA, A.; SUGIYAMA, T.; SHIMADA, Y. A retrospective analysis of periodontitis during bevacizumab treatment in metastatic colorectal cancer patients. **Int J Clin Onc** v. 18, p. 1020-4, 2013.
49. 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. 235-40, 2007.
50. PARK, C.H.; ABRAMSON, Z.R.; TABA, M. JR.; JIN, Q.; CHANG, J.; KREIDER, J.M.; GOLDSTEIN, S.A.; GIANNOBILE, W.V. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. **J Periodontol.** v. 78, p. 273- 281, 2007.
51. PAVONE, C.; PERUSSI, L.R.; DE OLIVEIRA, G.J.; SCARDUELI, C.R.; CIRELLI, J.A.; CERRI, P.S.; JUNIOR, E.M.; SPOLIDORIO, L.C.; MARCANTONIO, R.A. Effect of Er,Cr:YSGG laser application in the treatment of experimental periodontitis. **Lasers Med Sci.** Jan 30, 2014. [Epub ahead of print]
52. POLAK, D.; WILENSKY, A.; SHAPIRA, L.; et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: Bone loss and host response. **J Clin Periodontol** v. 36, p. 406-410, 2009.

53. 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.
54. ROVIN, S.; COSTICH, E.R.; GORDON, H.A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J Periodontal Res** v. 1, p. 193-204, 1966.
55. SALTZ, L.B.; KEMENY, N.E., Adjuvant Chemotherapy of Colorectal Cancer. **Oncologist**, v. 1(1 & 2), p. 22-29, 1996.
56. SHURIN G.V., A.N., SHURIN M.R. Cancer Therapy and Dendritic Cell Immunomodulation, in Dendritic Cells in Cancer, **M.R.S.a.R.D. Salter, Ed, Springer**: NY. 2009. p. 201-216.
57. 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.
58. TATAKIS, D.N.; GUGLIELMONI, P. HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. **J Periodontol.** v. 71, p. 1395-400, 2000.
59. TAYLOR, S.G. 4TH; MURTHY, A.K.; VANNETZEL, J.M.; COLIN, P.; DRAY, M.; CALDARELLI, D.D.; SHOTT, S.; VOKES, E.; SHOWEL, J.L.; HUTCHINSON, J.C.; et al. Randomized comparison of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil infusion followed by radiation versus concomitant treatment in advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol.** v. 12, p. 385-95, 1994.
60. THEODORO, L.H.; CAIADO, R.C.; LONGO M.; NOVAES, V.C.; ZANINI, N.A.; ERVOLINO, E.; de ALMEIDA, J.M.; GARCIA, V.G. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. **Lasers Med Sci.** Apr 15, 2014. [Epub ahead of print]
61. 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.
62. VERMORKEN, J.B; PEYRADE, F; KRAUSS J; MESIA R; REMENAR, E; GAULER, T.C; KEILHOLZ, U; DELORD, J.P; SCHAFHAUSEN, P; ERFAN, J; BRÜMMENDORF, T.H; IGLESIAS, L; BETHE, U; HICKING, C; CLEMENT, P.M. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). **Ann Oncol** v. 25(3), p. 682-8, 2014.

63. WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov**.v. 4, p. 307-20, 2005.
64. WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chem Biol Interact**. v. 147, p. 309–18, 2004.
65. 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
66. 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



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.

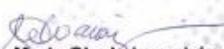
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Abril de 2017.

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