



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**THAYANNE BRASIL BARBOSA**

**EFEITO DO 5-FLUOROURACIL NA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR  
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

**FORTALEZA**

**2015**

**THAYANNE BRASIL BARBOSA**

**EFEITO DO 5-FLUOROURACIL NA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR  
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Vilma de Lima

**FORTALEZA**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

B213e      Barbosa, Thyanne Brasil.  
              Efeito do 5-fluorouracil na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em  
              ratos./ Thyanne Brasil Barbosa. – 2015.  
              82 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Profa. Dra. Vilma de Lima.

1. Reabsorção óssea. 2. Inflamação. 3. Imunossupressão. I. Título.

---

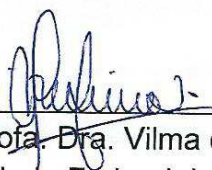
CDD 617.632

THAYANNE BRASIL BARBOSA

***Efeito do 5-Fluorouracil na reabsorção óssea  
alveolar induzida por ligadura em ratos “***

Dissertação de Mestrado em Farmacologia submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 30 de abril de 2015.



---

Prof. Dra. Vilma de Lima  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
(Orientadora)



---

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará – UFC



---

Prof. Dra. Renata Ferreira Carvalho Leitão  
Universidade Federal do Ceará – UFC.

“And why do we fall? So we can learn to  
pick ourselves up.”

(Thomas Wayne, *Batman Begins*)

Ao meu marido, Carlos Henrique.

Ao meu filho, Guilherme.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Vilma de Lima, por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ribeiro, pelos momentos de inspiração científica compartilhados em suas aulas e pela contrapartida na realização deste trabalho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Prof. Dra. Geanne Matos, por todo o suporte e incentivo para a conclusão da minha Pós-Graduação.

À Profa. Dra. Letícia Lotufo, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia à época de meu ingresso, pelo incentivo na realização de meu mestrado.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina (UFC), por todos os momentos científicos compartilhados.

Aos professores Ana Cristina de Mello Fiallos, Mariana Lima Vale e Ricardo de Freitas Lima, pela contribuição no aprimoramento deste trabalho.

Ao doutorando Eudmar Marcolino, por sua ajuda na realização das dosagens de MPO e citocinas presentes neste estudo.

À doutoranda Iracema Melo, pelos sábios conselhos e por todos os conhecimentos que me transmitiu. Sua participação foi essencial para a conclusão deste trabalho.

À mestranda Vilana Araújo, pelos momentos de parceria no laboratório e pela dedicação na realização deste trabalho.

À Mestre Mariana Guimarães, por sua contribuição na realização deste trabalho.

Às pós-graduandas Ana Patrícia e Karinn Soares, pelos momentos de convivência e troca de experiências no laboratório.

Aos estudantes de iniciação científica Bianca Kurita, Edgar Lassance, Marina Fiúza e Tereza Forte, pela colaboração na execução dos diversos ensaios contidos neste trabalho e pelo cuidado com os animais que foram utilizados neste estudo.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, especialmente à Adauto Rodrigues de Sousa, Alana Carvalho Bezerra Viana, a Alceu Machado de Sousa, a Antônio Haroldo Pinheiro Ferreira, à Aura Rhanes, à Célia Araújo de Carvalho, à Laura Alves de Souza, à Maria Silvandira França Pinheiro, à Naiara Felipe Alves e a Rômulo Chaves, por todos os serviços prestados à Universidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo e pelo suporte financeiro prestado a este trabalho.

### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A Deus, pelo dom da vida.

À minha mãe, Patrícia Brasil, e à minha tia, Ravigna Brasil, por todo o carinho e suporte que me proporcionaram chegar até este momento.

Ao meu marido, Carlos Henrique, por todo o companheirismo e dedicação que me reserva. Nosso amor é o alicerce sobre o qual construí uma nova vida. Essa conquista também é sua.

Ao meu filho, Guilherme, por compreender meus momentos de ausência e pelo amor incondicional.

À Maria Salete e Samuel, pilares da nova família que me acolheu com todo amor do mundo.

A Eudmar Marcolino, por ser meu melhor amigo e ajudar a carregar o peso do dia-a-dia na Pós-Graduação.

A Bruno Soares, por escutar minhas angústias, dividir os problemas e ser um amigo fiel e dedicado.

Às minhas amigas Iracema Melo e Vilana Araújo, por transformar um convívio profissional em uma amizade duradoura.

A Edilson Martins, pelos momentos divertidos e pela amizade que compartilhamos. Espelhe-me em suas conquistas e desejo-lhe o melhor.

Aos meus amigos Karoline, Humberto, Marília, Nicéa, Sarah e Wilker, pela força que deram durante todo o período que estive na Pós-Graduação.



## RESUMO

**Introdução:** O 5-fluorouracil (5-FU) é uma pirimidina utilizada em diversos protocolos para o tratamento do câncer e sua administração causa diversos efeitos adversos. Recentemente, seu papel na perda óssea tem sido estudado, já que o 5-FU mostrou diminuição da densidade mineral óssea e inibição do crescimento em ratos jovens. Assim, objetivou-se investigar se o efeito do 5-FU na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. **Métodos e resultados:** 146 Ratos *Wistar* (180-220 g; n=6-10) foram divididos em quatro grupos em que receberam água destilada (2 ml/kg; IP) ou 5-FU (37,5, 75 ou 150 mg/kg; IP), 1 hora antes da colocação da ligadura, sendo sacrificados no 11º dia. As hemiarcadas foram direcionadas análises morfométrica (mm<sup>2</sup>), histopatológica e histométrica (mm<sup>2</sup>). Adicionalmente, foram realizadas dosagens de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; pg/mg), MPO (U/mg) e fosfatase alcalina total e óssea (U/ml). Sobrevida, leucograma, variação de massa corpórea e condições hepáticas, renais e esplênicas também foram avaliadas.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O trabalho foi aprovado no comitê de ética em pesquisa. Observou-se que a ligadura causou uma importante perda óssea alveolar e na região de furca, aumento na atividade de MPO, nas concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de diminuição da FAO. Em relação ao histopatológico, foram observadas maiores lesões de furca, destruição de osso alveolar e infiltrado inflamatório em hemiarcadas do grupo NT em comparação ao normal ( $p < 0,05$ ). Embora o 5-FU não tenha sido capaz de aumentar a atividade de MPO em relação ao grupo NT, ele promoveu uma exacerbação da destruição periodontal, evidenciando uma maior perda óssea alveolar e na região de furca ( $p < 0,05$ ). Outro aspecto observado foi o aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ainda, o fármaco promoveu diminuição nos valores de FAO em relação ao grupo normal ( $p < 0,05$ ). Os animais que receberam 5-FU também mostraram intensa destruição das estruturas periodontais e presença de infiltrado inflamatório no histopatológico. Sistemicamente, o 5-FU na dose de 150 mg/kg causou neutropenia, diminuição na sobrevida e da massa corpórea dos animais. Não foram observadas alterações nas condições hepáticas, renais ou esplênicas avaliadas. **Conclusão:** Em suma, a administração de 5-FU exacerbou a reabsorção óssea induzida por ligadura e induziu o aumento de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , citocinas envolvidas no processo de reabsorção óssea. A neutropenia causada pela administração do fármaco pode ter contribuído para exacerbar a destruição das estruturas de suporte do dente.

**Palavras-chave:** 5-fluorouracil. Reabsorção óssea. Inflamação. Imunossupressão.

## ABSTRACT

### EFFECT OF 5-FLUOROURACIL IN LIGATURE-INDUCED ALVEOLAR BONE RESORPTION IN RATS

**Introduction:** 5-fluorouracil (5-FU) is a highly used anticancer drug. Its administration causes several side effects and its role in bone loss has been recently studied, since 5-FU showed a decrease in bone mineral density and growth inhibition in young rats. The aim of our study was to investigate the effect of 5-FU on the in ligature-induced bone resorption in rats. **Methods and results:** 146 *Wistar* rats (180-220 g) were divided in four groups that received distilled water (2 ml/kg, IP) or 5-FU (37.5, 75 or 150 mg/kg, IP 1 hour before the ligature placement. Sacrifice was performed at 11<sup>th</sup> day. Hemiarcs were submitted to macroscopic (mm<sup>2</sup>), histologic or histometric (mm<sup>2</sup>) analyses. In addition, cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ; pg/mg) were dosed and the assessment of MPO activity (U/mg) and total and bone-specific alkaline phosphatase (U/ml) was performed. Survival, leukogram, body mass variation and liver, kidney and spleen conditions were also evaluated.  $p < 0.05$  was considered significant. The study was approved by the ethics committee in animal research. Ligature placement caused an important alveolar area bone loss, including the furcation area. It also caused an increase in the MPO activity, in the concentrations of TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , and diminished bone-specific alkaline phosphatase. It was observed greater furcation lesions, alveolar bone destruction and an increase in the inflammatory infiltrate when compared to normal ( $p < 0.05$ ). Although 5-FU did not increase MPO activity when compared with NT, it promoted an exacerbation of the periodontal destruction, with a severe alveolar bone loss, including the furcation area when compared with NT ( $p < 0.05$ ). Another finding was the increased concentration of TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . In addition, 5-FU groups presented lower values of bone-specific alkaline phosphatase when compared to normal ( $p < 0.05$ ). It was also observed a severe destruction of the periodontium and a marked inflammatory infiltrate. Systemically, 5-FU (150 mg/kg) caused neutropenia, diminished rate of survival and loss of weight. Finally, it was not observed alterations in the hepatic, renal, or splenic conditions. **Conclusion:** Briefly, 5-FU increased ligature-induced bone resorption and the concentration of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , cytokines that are involved in the bone resorption process. Neutropenia was caused by the administration of the drug and contributed to exacerbate the destruction of the periodontium.

**Keywords:** 5-fluorouracil. Bone resorption. Inflammation. Immunossuppression.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Etapas da remodelação óssea na unidade multicelular básica.....  | 17 |
| Figura 2 – Estrutura química do 5-fluorouracil (5-FU).....  | 26 |
| Figura 3 - Procedimento para execução do modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....  | 33 |
| Figura 4– Esquematização das análises utilizadas na metodologia.....  | 34 |
| Figura 5 – Mensuração da perda óssea alveolar por análise morfométrica.....   | 36 |
| Figura 6 - Mensuração da perda óssea na região de furca por análise histométrica.....   | 37 |
| Figura 7 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....   | 43 |
| Figura 8- Aspecto macroscópico do periodonto de ratos normais (a) ou submetidos à reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura – não-tratado (b) ou 5-FU 37,5 (c), 75 (d) e 150 (e).....           | 44 |
| Figura 9 - Fotomicrografias evidenciando o efeito do 5-FU na perda óssea da área de furca do segundo molar superior de ratos submetidos à reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura.....        | 46 |
| Figura 10 - Fotomicrografias evidenciando o efeito do 5-FU sobre as estruturas periodontais de ratos submetidos à reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura ..                                  | 48 |
| Figura 11 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na atividade de mieloperoxidase em tecido gengival em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....                             | 51 |
| Figura 12 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre os níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total e Fosfatase Alcalina Óssea em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos..... | 52 |
| Figura 13 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na expressão de TNF- $\alpha$ (A) e IL-1 $\beta$ (B) em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....                           | 54 |
| Figura 14 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) no percentual de sobrevida em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....   | 55 |
| Figura 15 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre a variação de massa corpórea em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....   | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 01- Avaliação histométrica do efeito do 5-FU em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....   | 46 |
| Tabela 02- Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na análise histopatológica em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....   | 48 |
| Tabela 03- Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre a contagem de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.....                           | 57 |
| Tabela 04- Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre os níveis séricos de transaminases hepáticas (TGO e TGP), ureia, creatinina e índices de órgãos em modelo de reabsorção óssea induzida por ligadura em ratos..... | 58 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |  |
|---------------|--|
| 5-FU          | 5-fluorouracil   |
| ACS           | Sociedade Americana do Câncer                            |
| BMU           | Unidade multicelular básica                              |
| CCS           | Centro de Ciências da Saúde                              |
| CEUA          | Comitê de Ética para Uso de Animais                      |
| CONCEA        | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal   |
| DPD           | Di-hidropirimidina desidrogenase                         |
| EDTA          | Ácido etilenodiamino tetra-acético                       |
| FAO           | Fosfatase alcalina óssea                                 |
| FAT           | Fosfatase Alcalina Total                                 |
| FdUMP         | Monofosfato de fluorodeoxirudina                         |
| FdUTP         | Trifostato de fluorodeoxirudina                          |
| FUTP          | Trifostato de fluorouridina                              |
| HE            | Hematoxilina e eosina                                    |
| HTAB          | Brometo de hexadeciltrimetilamonio                       |
| IGF-I         | Fator de crescimento semelhante à insulina               |
| IL-10         | Interleucina 10  |
| IL-1 $\beta$  | Interleucina 1 $\beta$                                   |
| IL-4          | Interleucina 4   |
| IL-5          | Interleucina 5   |
| IL-6          | Interleucina 6   |
| IL-12         | Interleucina 12  |
| IL-13         | Interleucina 13  |
| IL-17         | Interleucina 17  |
| INF- $\gamma$ | Interferon $\gamma$                                      |
| IP            | Intraperitoneal  |
| LPS           | Lipopolissacarídeos                                      |
| M-CSF         | Fator estimulante de crescimento de colônia de monócitos |
| MMP           | Metaloproteinases de matriz                              |
| MPO           | Mieloperoxidase  |
| MTX           | Metotrexato  |
| OMS           | Organização Mundial da Saúde                             |

|               |  |
|---------------|--|
| OPD           | O-fenilenediamina diidrocloreto                |
| OPG           | Osteoprotegerina                               |
| OSCAR         | Receptor associado a osteoclasto               |
| PAMPs         | Padrões moleculares associados a patógenos     |
| PBS           | Tampão fostato-salina                          |
| PGE2          | Prostaglandina E2                              |
| PMN           | Polimorfonucleares                             |
| PTH           | Paratormônio                                   |
| RANKL         | Ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B |
| RNAm          | RNA mensageiro                                 |
| TGO           | Transaminases glutâmico oxalacética            |
| TGP           | Transaminase glutâmico pirúvica                |
| TLR           | Receptores <i>toll-like</i>                    |
| TMB           | 3',3',3,3-tetrametilbenzidina                  |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa                  |
| Treg          | Células T reguladoras                          |
| UFC           | Universidade Federal do Ceará                  |

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| <b>1.1 Metabolismo ósseo</b> .....   | 17 |
| <b>1.2 Perda óssea inflamatória na periodontite</b> .....  | 20 |
| <b>1.3 Modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura</b> .....                         | 22 |
| <b>1.4 Quimioterapia do câncer</b> .....   | 24 |
| <b>1.5 5-Fluorouracil (5-FU)</b> .....   | 26 |
| <b>1.6 Justificativa e relevância</b> .....  | 29 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | 31 |
| <b>2.1 Geral</b> .....   | 31 |
| <b>2.2 Específicos</b> .....   | 31 |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 32 |
| <b>3.1. Seleção dos animais</b> .....  | 32 |
| <b>3.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais</b> .....   | 32 |
| <b>3.3. Fármacos e soluções utilizados</b> .....   | 33 |
| <b>3.4. Modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura</b> .....                        | 34 |
| 3.4.1. Avaliação da perda óssea induzida por ligadura .....  | 35 |
| <b>3.4.1.1. Avaliação do tecido periodontal e atividade osteoblástica</b> .....                    | 35 |
| A) <i>Análise morfométrica do osso alveolar</i> .....  | 36 |
| B) <i>Análise histométrica do osso alveolar</i> .....  | 37 |
| C) <i>Análise histopatológica do osso alveolar</i> .....   | 38 |
| D) <i>Ensaio de mieloperoxidase (MPO)</i> .....  | 39 |
| E) <i>Avaliação da dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO)</i> .....                      | 40 |
| F) <i>Avaliação dos níveis de TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math> por ELISA</i> ..... | 40 |
| <b>3.4.1.2. Avaliação sistêmica</b> .....  | 41 |
| A) <i>Sobrevida</i> .....  | 41 |
| B) <i>Varição de massa corpórea</i> .....  | 41 |
| C) <i>Leucograma</i> .....   | 41 |
| D) <i>Avaliação hepática</i> .....   | 42 |
| E) <i>Avaliação renal</i> .....  | 42 |

|  |    |
|--|----|
| <i>F) Avaliação esplênica</i> .....  | 43 |
| <b>3.5. Análise estatística</b> .....  | 43 |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....  | 44 |
| <b>4.1 Avaliação da perda óssea induzida por ligadura</b> .....                                    | 44 |
| 4.1.1 Avaliação do tecido periodontal e atividade osteoblástica .....                              | 44 |
| <i>A) Análise morfométrica do tecido ósseo alveolar</i> .....                                      | 44 |
| <i>B) Análise histométrica do osso alveolar</i> .....  | 46 |
| <i>C) Análise histopatológica do osso alveolar</i> .....   | 48 |
| <i>D) Ensaio de mieloperoxidase (MPO)</i> .....  | 52 |
| <i>E) Avaliação da dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)</i> .....                      | 53 |
| <i>F) Avaliação dos níveis de TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math> por ELISA</i> ..... | 54 |
| 4.1.2 Avaliação sistêmica .....  | 55 |
| <i>A) Sobrevida</i> 55   |    |
| <i>B) Variação de massa corpórea</i> .....   | 56 |
| <i>C) Leucograma</i> .....   | 57 |
| <i>D) Avaliação da função hepática e renal</i> .....   | 58 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....   | 60 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....   | 70 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 71 |
| <b>ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL -CEPA</b><br>.....                    | 84 |



# 1 INTRODUÇÃO

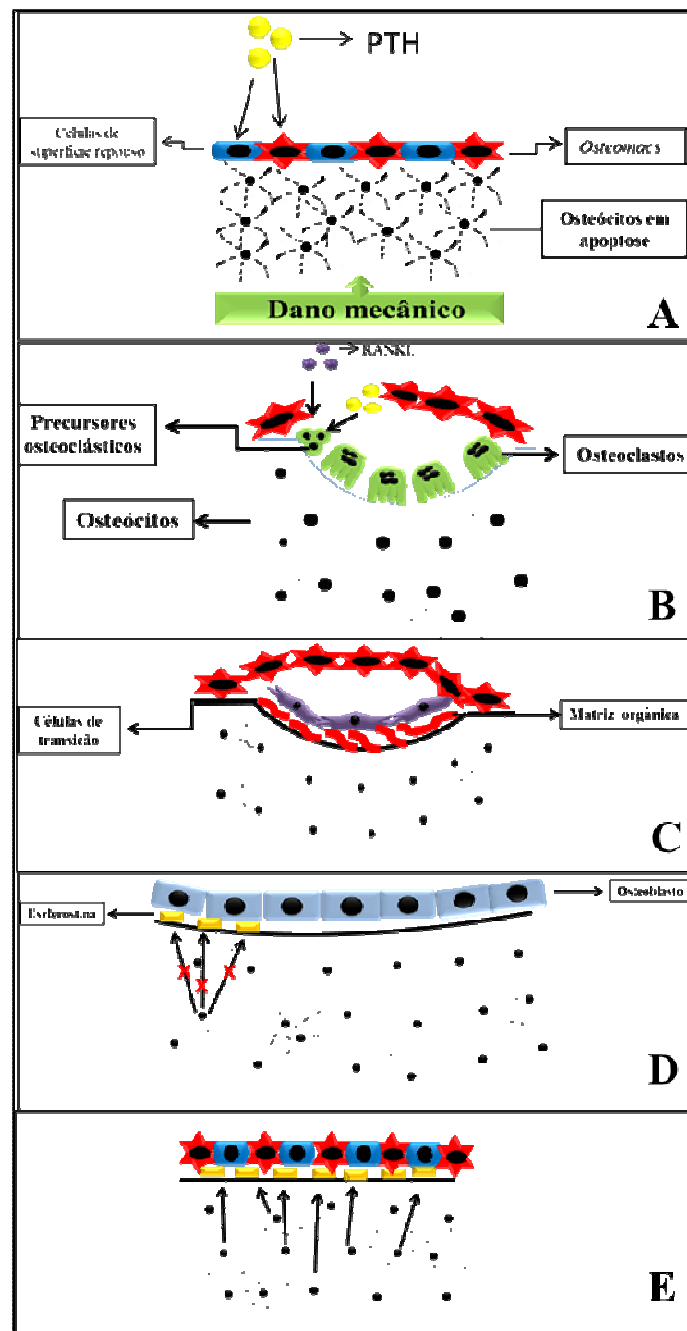
## 1.1 Metabolismo ósseo

A estrutura óssea possui um importante papel nos vertebrados por desempenhar ou influenciar diretamente em diversas funções como sustentação, locomoção, produção de células sanguíneas (função da medula óssea), liberação e estoque de minerais (cálcio, por exemplo) e proteção de órgãos vitais (PROFF; RÖMER, 2009). O processo de remodelação, responsável pela homeostasia do cálcio e manutenção do esqueleto, ocorre de forma contínua e é resultado da ação de células que comandam a reabsorção e aposição de material ósseo (HENRIKSEN et al., 2011).

Três principais tipos de células compõem, juntamente com os vasos sanguíneos, a chamada unidade multicelular básica (BMU, do inglês *basic multicellular unit*) (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010) e estão diretamente relacionados ao processo de remodelação óssea: os osteoblastos, responsáveis pela aposição de matriz óssea; os osteoclastos, que reabsorvem material ósseo; e, finalmente, os osteócitos, que regulam a atividade de osteoblastos e osteoclastos (HENRIKSEN et al., 2009, 2011). Além destas, células do sistema imune, como linfócitos T e B e megacariócitos, também podem participar deste processo (LI et al., 2007).

O ciclo de remodelação óssea pode ser didaticamente dividido em fases, sendo a primeira a ativação, momento em que é gerado um sinal (liberação de paratormônio (PTH), por exemplo) que será responsável pelo desencadeamento da fase subsequente, a reabsorção (Figura 1). Os precursores osteoclásticos então recrutados, se diferenciam em osteoclastos maduros, desencadeando o processo de reabsorção óssea (NAKASHIMA et al., 2011; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). Os osteoblastos participam ativamente desta fase aumentando a expressão de fator estimulante de crescimento de colônia de monócitos (M-CSF) e ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANKL) e diminuindo a osteoprotegerina (OPG) (MA et al., 2001). A ligação de RANKL a o seu receptor RANK é responsável pelo processo de osteoclastogênese e também é um evento presente em alterações patológicas que promovam reabsorção óssea, como a artrite (LEE et al., 2011).

Figura 1 – Etapas da remodelação óssea na unidade multicelular básica.



O ciclo de remodelação óssea pode ser didaticamente dividido em fases, sendo a primeira a ativação (A), momento em que é gerado um sinal (liberação de paratormônio (PTH), por exemplo) que será responsável pelo desencadeamento da fase subsequente, a reabsorção. Os precursores osteoclásticos então recrutados e, ao serem estimulados por fatores M-CSF e RANKL, se diferenciam em osteoclastos maduros (B). Após a reabsorção da matriz óssea pelos osteoclastos, células mononucleadas (células de transição) preparam a lacuna óssea para a aposição de matriz pelos osteoblastos, caracterizando a fase de transição (C). Uma vez que a superfície óssea está preparada, os osteoblastos iniciam a fase de formação, que é marcada pela aposição óssea promovida por essas células (D). Os osteoclastos participam desse processo ao cessar a produção de esclerostina, um inibidor de atividade osteoblástica. Finalmente, uma vez encerrada a aposição óssea, ocorre o reestabelecimento da superfície óssea, com a diferenciação de osteoblastos em osteócitos e a normalização da produção de osteopontina (E). (Adaptado de Raggatt, Partridge, 2010)

Após a reabsorção da matriz óssea pelos osteoclastos, tem início a fase de transição, que é comandada por células mononucleadas (células de transição) responsáveis por preparar a lacuna óssea para a aposição de matriz pelos osteoblastos (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010) (Figura 1). Tais células, cuja linhagem ainda não foi esclarecida, trabalham junto com os *osteomacs*, macrófagos residentes no tecido ósseo, na produção de osteopontina e na remoção de matriz a partir da produção de metaloproteinases de matriz (MMP) (EVERTS et al., 2002; NEWBY, 2008; TAKAHASHI et al., 2004).

A aposição de matriz óssea por osteoblastos é o principal evento da fase de formação (Figura 1). Ainda não há um consenso sobre a sinalização que promove a mudança da fase de transição para a formação, contudo especula-se que seja resultado de interações entre osteoblastos e osteoclastos (MARTIN; SIMS, 2005). A liberação de esfingosina-1-fosfato por osteoclastos, além da expressão do ligante do receptor EphB4 (presente em osteoblastos) são evidências que apontam nesse sentido (ZHAO et al., 2006).

Adicionalmente, os osteócitos podem participar desse processo em resposta a estímulos mecânicos ou hormonais, a partir da inibição da expressão de esclerostina, presente na membrana dessas células e responsável por inibir a via de sinalização *Wnt*, importante para a formação óssea (ROBLING et al., 2008). Essas células também parecem estar envolvidas na etapa subsequente, que se refere ao encerramento do ciclo de remodelação. A fase de término é caracterizada pelo reestabelecimento da superfície óssea, com a diferenciação de osteoblastos em osteócitos (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010) (Figura 1).

O equilíbrio dos mecanismos de remodelação óssea pode ser alterado em diversas condições, como no tratamento farmacológico de algumas doenças, a exemplo de quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer (BRAUN e SCHETT, 2012; GEORGIU et al., 2012; LEEUWEN, VAN et al., 2003; NADHANAN et al., 2012; SALA e BARR, 2007; SHANDALA et al., 2012; XIAN et al., 2004, 2006, 2007), ou até mesmo por processos inflamatórios subjacentes a estados patológicos, como a osteoporose e a periodontite (BRAUN; SCHETT, 2012; GROSSI et al., 1995).

## 1.2 Perda óssea inflamatória na periodontite

A perda óssea inflamatória é um dos principais achados de patologias como a periodontite (KAYAL, 2013; SATO; TAKAYANAGI, 2006). A doença periodontal é uma patologia crônica que resulta da interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e as bactérias presentes na cavidade oral (BURT, 2005; MADIANOS; BOBETSIS; KINANE, 2005).

Segundo dados da Pesquisa Nacional de Avaliação Nutricional e Saúde (do inglês, NHANES), estima-se que ela acomete 46% dos americanos adultos, sendo que 8,9% dos casos são considerados severos (EKE et al., 2015). No Brasil, a presença de doença periodontal em adultos é de 19,4%, segundos dados do SB Brasil 2010 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Contudo, a prevalência da doença no país pode ser maior. Chambrone *et al.* (2008), em revisão de literatura, compilou dados de estudos epidemiológicos realizados entre 1993 e 2010 e concluiu que a prevalência geral da periodontite é de 92,92%. Os autores ainda ressaltaram a falta de estudos epidemiológicos que abranjam todas as regiões do país (CHAMBRONE; LIMA; CHAMBRONE, 2003).

Clinicamente, a periodontite promove a destruição progressiva dos tecidos de suporte do dente, como cemento e osso alveolar, podendo promover perdas dentárias (RAVALD; JOHANSSON, 2012). Além de seu efeito sobre o aparelho estomatognático, a doença periodontal é relacionada ao aumento da ocorrência de doenças cardiovasculares, parto prematuro e artrite reumatoide (CANTLEY et al., 2011; LEAL et al., 2015; YU et al., 2015).

O processo inflamatório observado na periodontite é desencadeado pela liberação de enzimas líticas e pela presença de lipopolissacarídeos (LPS) provenientes de bactérias, causando dano direto ou ainda promovendo a resposta inflamatória de forma indireta (MADIANOS; BOBETSIS; KINANE, 2005). Isso é possível graças à interação com os receptores *toll-like* (TLR). Esses receptores estão presentes em diversos tipos celulares, como fibroblastos, mastócitos e neutrófilos, e ao serem ativados pelos PAMPs (do inglês, *pathogens-associated molecular patterns*) estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BEKLEN et al., 2008; HAYASHI, 2003; SWAMINATHAN et al., 2013).

Em seguida, ocorre a liberação de histamina pelos mastócitos residentes, bem como de TNF- $\alpha$ , gerando alterações vasculares, como a expressão de moléculas de adesão no endotélio, e atraindo neutrófilos para o local da inflamação (HUANG et

al., 2012; OLIVEIRA et al., 2008). Os polimorfonucleares (PMN) são as primeiras células a chegar ao sítio infeccioso e seu mecanismo de defesa consiste na sua atividade fagocítica e na liberação de enzimas líticas, tais como a mieloperoxidase (MPO), causando, além da morte das bactérias, dano tecidual (KANTARCI; OYAIZU; VAN DYKE, 2003). Eles são considerados células-chave para o entendimento da progressão da periodontite, pois atuam ainda por outras vias, como ao induzir a reabsorção óssea por meio da expressão de RANKL ou até pelo recrutamento de linfócitos Th17 através da liberação de quimiocinas (CHAKRAVARTI et al., 2009; PELLETIER et al., 2014).

Outro aspecto importante a ser considerado na periodontite é a resposta humoral subsequente ao estímulo bacteriano, que é desencadeada pela interação de células T “virgens” com as células apresentadoras de antígenos. A partir deste contato, podem sobrevir diversos tipos de respostas mediadas por células Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg), de acordo com as citocinas produzidas (GAFFEN; HAJISHENGALLIS, 2008; GEMMELL; SEYMOUR, 2004; KRAMER; GAFFEN, 2007). Autores tem discutido o papel das citocinas envolvidas com a resposta humoral e observaram que IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  estão ligadas à resposta Th1, enquanto IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 parecem estar intimamente relacionadas com o perfil Th2 (BELARDELLI; FERRANTINI, 2002; O’GARRA, 1998). Finalmente, relacionou-se a secreção de IL-17 a células Th17. Essa citocina é tida como fundamental para que a ligação entre a resposta inata e adaptativa ocorra (KRAMER; GAFFEN, 2007).

O papel da citocinas é de suma importância para a exacerbação do quadro inflamatório periodontal. Górska *et al.* (2003) demonstraram que alterações nos perfis de expressão de determinadas citocinas possuíam relação direta com os achados clínicos da doença, como a perda óssea. Valores aumentados de IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  e diminuição da quantidade de IL-4 e IL-10 foram relacionados à piora do quadro periodontal (GÓRSKA et al., 2003).

O TNF- $\alpha$  é um importante indutor de osteoclastogênese ao estimular a produção de RANKL e precursores estromais (WEI et al., 2005). IL-1 $\beta$  age em conjunto, também aumentando a expressão de RANKL nesses precursores e estimulando a sua diferenciação em osteoclastos (WEI et al., 2005). Ainda, essas duas citocinas tem a capacidade de estimular a produção de outros mediadores como IL-6, IL-8, MMPs e prostaglandina E2 (PGE2) que possuem diferentes efeitos

na progressão da doença (YUCEL-LINDBERG; NILSSON; MODÉER, 1999). IL-6 promove um aumento na reabsorção óssea ao passo que estimula a formação de osteoclastos (AXMANN et al., 2009). IL-8, por sua vez, tem um papel fundamental no recrutamento e ativação de neutrófilos, sendo uma citocina abundantemente encontrada no fluido gengival de pacientes com periodontite (JIN; SÖDER; CORBET, 2000). As MMP são produzidas pelos fibroblastos e causam reabsorção da matriz colágena, contribuindo diretamente para o dano tecidual (BEKLEN et al., 2007). Finalmente, PGE2 causa uma suprarregulação de RANKL e inibição da expressão de OPG nas células osteoblásticas (BLACKWELL; RAISZ; PILBEAM, 2010)

Assim, ao estimular direta ou indiretamente o aumento dos valores de RANKL, os mediadores inflamatórios deslocam o equilíbrio existente na razão RANKL/OPG, promovendo reabsorção óssea e consequente destruição das estruturas periodontais (KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011). Em estudo clínico, Crotti *et al.* (2003) observaram uma maior expressão do RNA mensageiro (RNAm) de RANKL em pacientes com periodontite. Ainda, encontrou-se uma importante marcação celular para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), importante marcador de atividade osteoclástica, enquanto a expressão de OPG estava diminuída (CROTTI et al., 2003).

Finalmente, é importante considerar que as recentes descobertas a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão da doença periodontal podem não ser suficientes para o seu completo entendimento. Nesse sentido, a utilização de modelos de estudos se mostra então fundamental para o esclarecimento de aspectos ainda não considerados.

### **1.3 Modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura**

A utilização de modelos animais para a reprodução de determinadas condições patológicas é uma importante ferramenta em pesquisa científica. Um dos primeiros modelos de periodontite experimental foi primeiramente publicado por Sallay *et al.* (1982) e visava mimetizar as condições necessárias para o desenvolvimento da periodontite em ratos. O protocolo experimental consistia na inserção de um fio de sutura de seda ao redor do 2º molar superior de um rato previamente anestesiado, com o nó cirúrgico voltado para a face palatina do dente. A colocação dessa ligadura

promovia a perda óssea na região do desafio e a reabsorção encontrada era mensurada diretamente (SALLAY et al., 1982).

O modelo de ligadura promove uma importante perda óssea alveolar mediante uma reação de corpo estranho, além de possibilitar o acúmulo de placa na região de sua instalação (KUHR et al., 2004). O trauma da inserção do fio ao redor do dente do rato resulta na quebra da barreira epitelial e facilita a migração de bactérias para o periodonto (LIAO et al., 2014). O dano tecidual resultante desse processo exhibe características tais como a destruição das estruturas de suporte do dente e a presença de infiltrado leucocitário (LIMA et al., 2000, 2004).

Anteriormente, Crawford *et al.* (1978) estabeleceram um diferente protocolo de indução de perda óssea alveolar em ratos que se baseava na inoculação de bactérias periodontopatogênicas, ou seja, associadas a progressão da doença periodontal. Neste estudo, apresentou-se um novo método que consistia na utilização de silicone de impressão ao redor dos molares para a mensuração da reabsorção óssea vertical (CRAWFORD; TAUBMAN; SMITH, 1978).

A partir dos trabalhos de Crawford *et al.* (1987) e Sallay *et al.* (1982), diversos autores desenvolveram outros modelos de indução de perda óssea alveolar. A injeção de bactérias periodontopatogênicas ou mesmo de seus componentes (o LPS, por exemplo) é um dos modelos para estudo da periodontite experimental. Ao injetar o estímulo, espera-se uma agressão direta do componente bacteriano ao tecido periodontal, sem a necessidade de uma colonização secundária (GRAVES et al., 2012).

A inoculação de patógenos também pode ser realizada por gavagem, de forma que os microrganismos ficam suspensos em uma solução aquosa administrada por via oral (GRAVES et al., 2012). Esse modelo gera uma perda óssea compatível com a instalação de uma periodontite, com participação de diversos mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-12 e INF- $\gamma$  (GARLET et al., 2005).

Apesar da possibilidade de utilização de diversas espécies de animais, incluindo cachorros e macacos, os roedores, especialmente ratos e camundongos, são considerados mais convenientes para a indução da perda óssea alveolar mediante a utilização de ligadura. A similaridade da anatomia do periodonto, a facilidade de manipulação e a facilidade na obtenção de diferentes genomas são algumas das características que justificam essa afirmação (OZ; PULEO, 2011).

De Molon *et al.* (2014) compararam diferentes protocolos de indução de periodontite e concluíram que o modelo de ligadura, juntamente com a injeção de *Porphyromonas gingivalis*, é um dos mais representativos em ratos. Ainda, os autores reiteraram que a perda óssea gerada pela colocação do fio ao redor de um dos dentes molares gera uma reabsorção óssea que é mais intensa nos primeiros dias e tende a decair após 30 dias (DE MOLON *et al.*, 2014).

Diversos autores tem utilizado diferentes adaptações ao modelo proposto por Sallay *et al.* (1982), variando fatores como o tempo experimental, o tipo de animal utilizado, o método de mensuração da perda óssea, o material da ligadura e o local de sua instalação. A sua utilização possibilita o estudo da patogênese da doença periodontal, além de propiciar a avaliação da resposta do tecido ósseo à administração de diferentes fármacos (ASSUMA *et al.*, 1998; DI PAOLA *et al.*, 2004, 2007; GOES *et al.*, 2010, 2014; HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; JIN *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2000, 2004; LOHINAI *et al.*, 1998)

#### **1.4 Quimioterapia do câncer**

O termo câncer se refere a neoplasias malignas resultantes do crescimento de células transformadas, com potencial de invadir tecidos e órgãos, próximos ou distantes (ALMEIDA *et al.*, 2005). Uma vez modificadas, as células do tumor passam a interagir com células estromais, formando um microambiente propício ao crescimento tumoral (BARCELLOS-HOFF; LYDEN; WANG, 2013).

De acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), esta patologia é considerada uma das principais causas de morte entre a população mundial, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012. Estima-se ainda que, em duas décadas, o número de novos casos anuais da doença passará de 14 para 22 milhões (OMS, 2014). No Brasil, prevê-se que aproximadamente 576.580 novos casos podem surgir ainda em 2014 (INCA, 2014).

O câncer é um importante problema de saúde pública e possui um efeito considerável na economia global. Em estudo conduzido pela Sociedade Americana do Câncer (ACS) e pela Fundação *Livestrong*, pesquisadores descobriram que essa patologia apresenta o maior custo dentre as demais causas de morte, um prejuízo avaliado em cerca de 895 bilhões de dólares somente no ano de 2008 (ACS, 2010).



A etiologia dessa condição é multifatorial, na qual diversos riscos ambientais ou hereditários podem estar envolvidos. Desta maneira, seu tratamento costuma ser multimodal, abrangendo diversas modalidades terapêuticas, tais como a excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005)..

Desde a descoberta das propriedades antitumorais do gás de mostarda, fato que deu origem aos fármacos do grupo das mostardas nitrogenadas, diversas drogas tem sido desenvolvidas para o combate ao câncer (CHABNER; JR, 2005; PAPAC, 2002). A demonstração da atividade de um antagonista do folato sobre leucemia em crianças deu origem a implementação do tratamento com antimetabólitos, ainda amplamente utilizados em clínica oncológica (FARBER et al., 1948). O desenvolvimento de novos fármacos seguiu com o desenvolvimento de outras classes de agentes anticâncer, como os análogos da purina e da pirimidina, alcaloides da vinca, taxois, compostos de platina e, mais recentemente, a terapia-alvo, com substâncias agindo em pontos-chave do crescimento tumoral (CHABNER; JR, 2005; PAPAC, 2002).

A busca de fármacos cada vez mais específicos reflete uma característica importante do tratamento com fármacos antineoplásicos convencionais: os diversos efeitos colaterais, principalmente relacionados aos tecidos dotados de células constantemente em divisão (ALMEIDA *et al.*, 2005). Contudo, estudos tem mostrado que mesmo as mais recentes drogas possuem efeitos adversos importantes (SIVENDRAN et al., 2014).

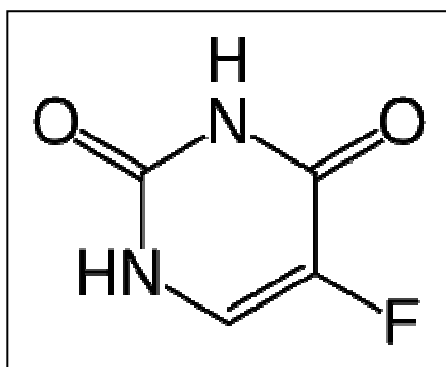
A toxicidade dos fármacos anticâncer se manifesta em todo o organismo, sendo relatados efeitos como as mucosites (MARTINEZ et al., 2014), cardiotoxicidade (KINGSLEY et al., 2014), neurotoxicidade (GUO et al., 2014), síndrome da mão e pé (HÉNIN et al., 2014), cistite (WANG et al., 2013) e perda óssea (PACCOU et al., 2014). Particularmente, os efeitos tóxicos dos antineoplásicos antimetabólitos, como o 5-fluorouracil (5-FU), tem sido extensamente discutidos na literatura (CORDIER et al., 2011; JENSEN; SØRENSEN, 2012; NOMURA et al., 2013; SCHWAB et al., 2008), com particular enfoque para seus efeitos no trato gastrointestinal (LIMA et al., 2005; MAIOLI et al., 2014; YOSHINO et al., 2013). Adicionalmente, tem sido demonstrado que o 5-FU pode promover perda óssea e retardo no crescimento de ratos jovens (NADHANAN et al., 2012; XIAN et al., 2004, 2006).

## 1.5 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-fluorouracil é um fármaco pertencente à classe das pirimidinas fluoretadas, que foi primeiramente sintetizado em 1957 (DUSCHINSKY; PLEVEN; HEIDELBERGER, 1957). Seu desenvolvimento apoiou-se na observação de que hepatomas em ratos utilizavam uracila marcada radiativamente de forma mais ávida do que os tecidos normais, sugerindo o papel dessa base nitrogenada pirimídica no crescimento tumoral (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

Por ser um análogo da uracila, o 5-FU é transportado rapidamente para o interior da célula utilizando o mesmo transportador de pirimidina (DOMIN; MAHONY; ZIMMERMAN, 1993). No interior da célula, o fármaco é convertido nos metabólitos ativos monofosfato de fluorodeoxirudina (FdUMP), trifostato de fluorodeoxirudina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP), responsáveis pela interrupção na síntese de RNA e da ação da timidilato sintase, enzima responsável pela síntese de nucleotídeos (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Estima-se que aproximadamente 80% do fármaco esteja suscetível ao metabolismo de primeira passagem pela enzima di-hidropirimidina desidrogenase (DPD), tornando a administração endovenosa como padrão nos esquemas terapêuticos em que era incluído (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MALET-MARTINO; JOLIMAITRE; MARTINO, 2002).

Figura 2 – Estrutura química do 5-fluorouracil (5-FU)



Fonte: Guerrero-Ramírez e Katime, 2011.

Tendo em vista seu mecanismo de ação citotóxico, o 5-FU tornou-se um agente importante na quimioterapia do câncer, já tendo sido utilizado em protocolos contra tumores do trato gastrintestinal, de mama e de cabeça e pescoço (MALET-

MARTINO; JOLIMAITRE; MARTINO, 2002). Por apresentar resposta limitada quando administrado sozinho, ele é associado a outros agentes quimioterápicos com o objetivo de aumentar a sua atividade e diminuir a ocorrência de resistência tumoral ao tratamento (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Atualmente, é considerado tratamento de escolha em tumores avançados de cólon, em associação com a leucovorina (VAN KUILENBURG *et al.*, 2007). Além desta associação, é frequentemente administrado de forma conjunta a outros fármacos, gerando diferentes protocolos terapêuticos, tais como o CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil), FUFOX (com a oxaliplatina), o FLP (com a cisplatina), FOLFIRI (com o irinotecano) e o FLOT (com a oxaliplatina e o docetaxel) (BLASHCKE *et al.*, 2013)

Diversas toxicidades têm sido associadas ao uso do 5-FU, dentre elas mielossupressão, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, síndrome da mão e pé, náuseas, vômitos, diarreias e mucosite (MALET-MARTINO e MARTINO, 2002). Recentemente, tem-se estudado o seu papel na perda óssea decorrente da quimioterapia, sendo uma possível causa do risco aumentado de fraturas (NADHANAN *et al.*, 2012; XIAN *et al.*, 2004; XIAN *et al.*, 2006). A observação da diminuição da densidade mineral óssea de mulheres pré-menopausa que receberam quimioterapia adjuvante (o regime CMF, por exemplo) foi um dos primeiros indícios desse efeito adverso dos fármacos anticâncer (BRUNING *et al.*, 1990). A administração dos quimioterápicos promove uma antecipação da menopausa, deixando as mulheres mais suscetíveis à perda óssea. A diminuição da densidade mineral em ossos como as vértebras pode se manifestar até seis meses após o início do tratamento. (SHAPIRO; MANOLA; LEBOFF, 2001)

Contudo, o mecanismo molecular a partir do qual os agentes quimioterápicos promovem o desequilíbrio das vias de remodelação óssea permanece incerto. Sabe-se que o fármaco atua causando inibição da atividade osteoblástica e estimulação do recrutamento de osteoclastos (XIAN *et al.*, 2007; XIAN *et al.*, 2008). A produção de citocinas inflamatórias e moléculas osteoclastogênicas, como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e RANKL, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), parecem estar envolvidas nesse processo (NADHANAN *et al.*, 2012).

Ainda não foi estabelecido um tratamento para a perda óssea induzida por quimioterápicos (NADHANAN *et al.*, 2012). Estudos clínicos utilizando bisfosfonatos, fármacos empregados na terapia da osteoporose, apresentaram dados divergentes (FULEIHAN *et al.*, 2005; HINES *et al.*, 2009). O clodronato apresentou resultados

satisfatórios quando administrado a pacientes pré-menopausa que receberam o regime CMF (SAARTO et al., 1997).

Em estudo com ratos, XIAN *et al.* (2004), utilizando uma dose única de 150 mg/kg, observaram diminuição na proliferação celular na placa de crescimento da tíbia, atribuindo ao 5-FU um papel pró-apoptótico, promovendo a morte de osteoblastos e seus precursores. Ainda, mostraram que, após 10 dias da administração, os animais tiveram menor crescimento em altura em comparação àqueles que não receberam o fármaco. A administração de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) promoveu uma discreta diminuição da apoptose de osteoblastos e células da metáfise (XIAN *et al.*, 2004).

NADHANAN *et al.* (2012) utilizaram o óleo de ema e mostraram que o composto, associado a propriedades anti-inflamatórias, foi capaz de suprimir a perda óssea induzida por 5-FU, sugerindo uma possível produção de mediadores inflamatórios pelo fármaco. Ainda, verificou-se um aumento na expressão de RNAm para RANKL, TNF- $\alpha$  e receptor associado a osteoclasto (OSCAR), indicando um aumento da atividade osteoclástica (NADHANAN *et al.*, 2012).

A ocorrência de periodontite em pacientes submetidos a quimioterapia do câncer foi relatada na literatura (OGAWA et al., 2013). A ocorrência de neutropenia resultante da imunossupressão causada pelo fármaco deixa o paciente suscetível a ação de microrganismos, tais como bactérias, fungos e vírus, e a bolsa periodontal pode se tornar um portal de entrada desses patógenos para a corrente sanguínea (RABER-DURLACHER et al., 2002).

Em estudo em ratos, Garcia et al. (2014) avaliaram a influência da administração de 5-FU na doença periodontal experimental. Neste trabalho, o fármaco foi administrado em doses de 80 e 40 mg/kg, que foram injetadas no 1º e 2º dia experimental, respectivamente. A ligadura de algodão foi colocada ao redor do segundo molar inferior e análises foram feitas 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura. Observou-se que o fármaco promoveu um aumento da reabsorção óssea e da destruição das estruturas periodontais. Ainda, o tratamento com raspagem não foi suficiente para impedir a progressão da periodontite nos animais que receberam o fármaco (GARCIA et al., 2014).

Considerando que a doença periodontal pode estar relacionada a diversas condições sistêmicas, sua ocorrência pode levar a complicações clínicas resultantes da bacteremia (RABER-DURLACHER et al., 2002). O tratamento da doença

periodontal mostrou resultados positivos em pacientes recebendo fármacos anticâncer, diminuindo a profundidade das bolsas periodontais e evitando a perda do elemento dentário (OGAWA et al., 2013; VOZZA et al., 2015).

### **1.6 Justificativa e relevância**

O aumento nos novos casos de câncer no mundo tem levado cada vez mais pessoas a se submeterem a tratamentos com fármacos anticâncer. Esses medicamentos possuem a característica de atuarem em células sob constante divisão, impedindo, assim, o crescimento tumoral (ALMEIDA et al., 2005). Contudo, a falta de especificidade de alguns desses fármacos pode levar ao surgimento de diversos efeitos indesejados, como a mucosite, a neurotoxicidade, a cardiotoxicidade e a perda óssea. Assim, a toxicidade promovida pela quimioterapia pode promover um aumento no tempo de hospitalização e nos gastos hospitalares (HASSETT et al., 2006).

A ocorrência de periodontite tem sido associada ao tratamento com antineoplásicos (OGAWA et al., 2013). Essa patologia se apresenta como um processo complexo, resultante da interação do sistema de defesa do organismo e os periodontopatógenos (HERNÁNDEZ et al., 2011). Contudo, a imunossupressão gerada pela administração do fármaco pode causar uma exacerbação no quadro periodontal, possibilitando uma maior destruição dos tecidos de suporte do dente e deixando o paciente suscetível a ocorrência de bacteremias e sepse (RABER-DURLACHER et al., 2002).

A ampla utilização do 5-FU em diversos protocolos de tratamento agrega importância a possíveis efeitos colaterais advindos de sua administração. Nos trabalhos de Xian *et al.* (2004,2006) e Nadhanan *et al.* (2012), o 5-FU mostrou uma ação inibitória sobre o metabolismo ósseo e o crescimento em ratos. Contudo, é necessário entender melhor as possíveis repercussões da administração do fármaco sobre o osso formado.

Portanto, a observação da ocorrência de perda óssea em ratos jovens, aliada a maior propensão ao desenvolvimento da periodontite no paciente submetido a quimioterapia do câncer incentiva a busca de respostas sobre os mecanismos envolvidos na interação entre antineoplásico e a remodelação óssea. Nesse sentido, nosso trabalho poderia esclarecer aspectos relacionados à ocorrência de perda

óssea em pacientes recebendo 5-FU, contribuindo para incentivar a prevenção de perdas dentárias, aumentando a qualidade de vida nesses pacientes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Investigar se o efeito do 5-flourouracil (5-FU) sobre o tecido ósseo em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar se o 5-FU promove alterações nos parâmetros macroscópicos, microscópicos e bioquímicos característicos da do modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura;
- Estudar a influência da administração de 5-FU no processo inflamatório encontrado no modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura;
- Avaliar se o 5-FU promove alterações nos parâmetros sistêmicos de ratos submetidos à reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Seleção dos animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 146 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina (FAMED) – UFC, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas com seis animais em cada uma delas. Todos receberam ração comercial e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos, sendo mantidos em temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados. O protocolo foi estabelecido de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O protocolo de estudo e o delineamento experimental foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) – UFC (nº 85/13).

#### 3.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais

Abridor de boca (adaptado pelo laboratório)

Agitador magnético 725<sup>a</sup> – Fisatom – São Paulo – São Paulo – Brasil

Alcoômetro Gay-Lussac – Incoterm – Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

Balança digital Bioprecisa BS3000 – Curitiba – Paraná - Brasil

Balança digital modelo MF6/ 1- Filizola – São Paulo – Brasil

Balança eletrônica de precisão– Sartorius BL 210S

Balança eletrônica de precisão FA2104N – Bioprecisa – Curitiba – Paraná  
Brasil

Banho-maria digital NT 245 – Nova Técnica Equipamentos – Piracicaba –  
São Paulo – Brasil

Capela 0216-21 – Quimis – Diadema – São Paulo – São Paulo

Centrífuga 80-2B – Centribio – São Paulo – São Paulo - Brasil

Centrífuga Eppendorf – 5804R – Hamburgo – Alemanha

Destilador modelo 016 – Fabbe Primar – São Paulo – São Paulo

Espátula 7 – Golgran – São Caetano do Sul – São Paulo – Brasil

Espectrofotômetro Uv-5100B – Senova – Xangai – China

Freezer -80 °C Ultrafreezer – Thermo Scientific - USA



Leitor de placas tipo ELISA modelo ELX 800 – Bio Tek instruments – EUA

Leitor de placas do tipo ELISA

Homogenizador de amostras – Polytron PT10-35 – Kinematica – Suíça

Máquina de gelo EGE 300M – Everest – Rio de Janeiro – Brasil

Microscópio óptico modelo 175045 – Zeiss – Alemanha

Microscópio óptico – Olympus BX41TF – Olympus Optical CO – Japão

Pinça clínica - Golgran – São Caetano do Sul – São Paulo – Brasil

Pipetas automáticas – LABMATE+- Reino Unido

Porta-agulha Mathieu- Golgran – São Caetano do Sul – São Paulo – Brasil

Refrigerador biplex 350 – Cônsul – São Paulo – São Paulo – Brasil

Tesoura cirúrgica - Golgran – São Caetano do Sul – São Paulo – Brasil

Vortex – Phoenix – Araraquara – São Paulo – Brasil

Vortex QL-901 – Biomixer - China

### **3.3. Fármacos e soluções utilizados**

5-fluorouracil (5-fluorouracila) – Eurofarma – São Paulo – São Paulo - Brasil

Álcool etílico P.A. – Dinâmica – Diadema – São Paulo – Brasil

Azul de metileno – VETEC – Rio de Janeiro – Rio de Janeiro - Brasil

Capilares heparinizados – Perfecta – São Paulo – São Paulo - Brasil

Conjunto de corantes para coloração diferencial em hematologia Instant-prov

- NewProv – Pinhais – Paraná – Brasil

Diaminobenzidina (DAB) -

EDTA (sal dissódico) P.A. – Dinâmica – Diadema – São Paulo – Brasil

Eosina – Merck - Alemanha

Formaldeído P.A. – Dinâmica – Diadema – São Paulo – Brasil

Hematoxilina – Merck - Alemanha

Kit para dosagem de fosfatase alcalina – Labtest- Lagoa Santa – Minas

Gerais – Brasil

Kit para dosagem de ureia – Labtest- Lagoa Santa – Minas Gerais – Brasil

Kit para dosagem de creatinina – Labtest- Lagoa Santa – Minas Gerais –  
Brasil

Kit para dosagem de TGO – Labtest- Lagoa Santa – Minas Gerais – Brasil

Kit para dosagem de TGP –Labtest – Lagoa Santa – Minas Gerais – Brasil

Kit para ELISA anti-rato TNF- $\alpha$  – R & D Systems - USA

Kit para ELISA anti-rato IL-1 $\beta$  - USA

Hidrato de Cloral hidratado – VETEC – Rio de Janeiro – Rio de Janeiro - Brasil

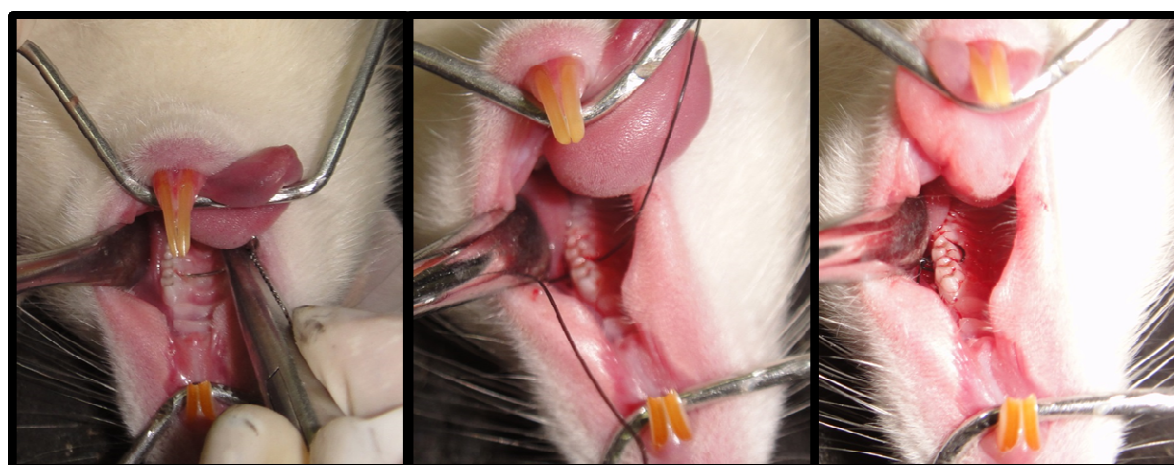
Hidróxido de Sódio P.A.em lentilhas – VETEC- Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – Brasil

Peróxido de hidrogênio a 30% - Sigma-Aldrich – St. Louis - USA

### 3.4. Modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura

Utilizou-se o modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura (LIMA et al., 2000, 2004), o qual consiste em inserir um fio de sutura de náilon 3.0 ao redor do segundo molar superior esquerdo de um rato anestesiado com hidrato de cloral a 10% (300 mg/kg; IP). Previamente à passagem do fio, utilizou-se uma guia (agulha) nos espaços interproximais mesial e distal do dente citado. Logo em seguida, o fio foi inserido e um nó cirúrgico foi realizado, estando o mesmo voltado para a face vestibular da cavidade oral do rato. Os animais foram sacrificados no 11<sup>o</sup> dia, considerado pico das lesões, onde se observa intensa perda óssea alveolar (LIMA et al., 2000).

Figura 3- Procedimento para execução do modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.



Passagem da agulha

Inserção do fio

Confecção do nó

Previamente à passagem do fio, utilizou-se uma guia (agulha) nos espaços interproximais mesial e distal do segundo molar superior esquerdo do animal. Logo em seguida, o fio foi inserido e um

nó cirúrgico foi realizado, estando o mesmo voltado para a face vestibular da cavidade oral do rato.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

**a) Grupo não-tratado (NT)**

Esse grupo foi constituído por 6 animais, os quais foram submetidos à indução da perda óssea. Os animais receberam água destilada (2 ml/kg; IP), trinta minutos antes da instalação do fio, sendo os animais sacrificados no 11º dia após a indução da perda óssea.

**b) Grupos 5-fluorouracil (5-FU)**

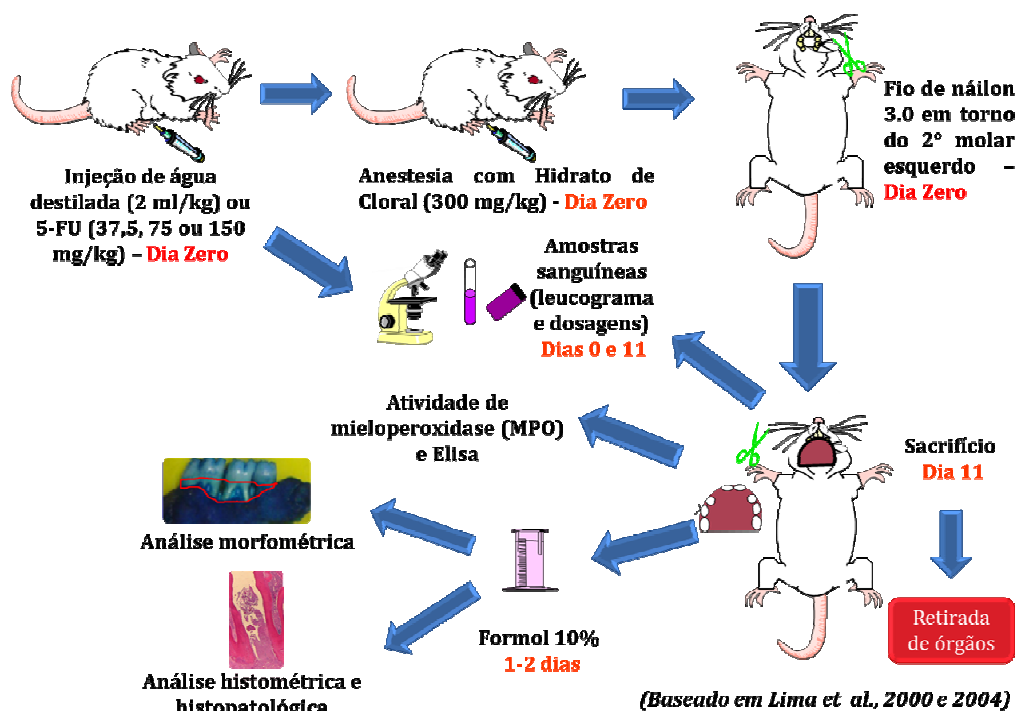
Os animais foram distribuídos em três grupos com 7-10 animais cada, os quais foram submetidos à indução da perda óssea por ligadura. O 5-FU foi administrado nas doses de 37,5, 75 ou 150 mg/kg (IP), trinta minutos antes da instalação do fio, sendo os animais sacrificados no 11º dia após a indução da perda óssea.

3.4.1. Avaliação da perda óssea induzida por ligadura

**3.4.1.1. Avaliação do tecido periodontal e atividade osteoblástica**

O tecido ósseo alveolar foi avaliado através das análises morfométrica, histométrica e histopatológica. O ensaio de mieloperoxidase (MPO) e a dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram realizados em macerado de gengiva. A atividade osteoblástica foi avaliada através dos níveis séricos de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) (Figura 4).

Figura 4 - Esquemática das análises utilizadas na metodologia.



Utilizou-se o modelo de perda óssea por ligadura (LIMA et al., 2000, 2004) que está representado nesse esquema. Primeiramente, administrou-se água destilada (2 ml/kg) ou 5-FU nas doses de 37,5, 75 ou 150 mg/kg via intraperitoneal trinta minutos antes da colocação da ligadura. Anestesiou-se o rato com hidrato de cloral a 10% (300 mg/kg; IP) e seguiu-se o protocolo experimental. Então, os animais foram sacrificados no 11º dia, considerado pico das lesões, onde se observa intensa perda óssea alveolar (LIMA et al., 2000). Após o sacrifício, a maxila foi retirada e conservada em formol a 10%, sendo processada para análises histopatológica e histométrica ou dissecada para análise morfométrica. Amostras de tecido gengival foram retiradas para realização de ensaio de MPO e citocinas. Amostras sanguíneas foram colhidas nos dias 0 e 11 para confecção de leucograma e realização de dosagens bioquímicas. Finalmente, fígado, baço e rim foram removidos para cálculo do índice de órgãos.

#### A) Análise morfométrica do osso alveolar

No 11º dia após a colocação da ligadura, os animais foram sacrificados e suas maxilas removidas e fixadas em formol tamponado a 10%, durante 24 horas. A seguir, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas, dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, com o objetivo de discriminar o osso dos dentes, os quais se coram em menor intensidade (LIMA et al., 2000, 2004). Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram acomodadas com massa de modelar em lâminas para microscópio e posteriormente fotografadas em câmera digital Sony Super SteadyShot® (modelo DSC-H1; Hong Kong, Japão). As imagens foram, então, avaliadas junto ao programa de computador ImageJ® (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA),

considerando demarcação desde a ponta de cúspide até a borda óssea remanescente, subtraída da respectiva área da hemiarcada contralateral normal, não-tratado próprio do animal. Todos os valores de área obtidos foram comparados a outro previamente conhecido ( $0,25 \times 0,25 \text{ mm}^2$ ), como descrito na literatura (GOES et al., 2010) (Figura 4).

Figura 5– Mensuração da perda óssea alveolar por análise morfométrica



A análise morfométrica foi feita considerando demarcação desde a ponta de cúspide até a borda óssea remanescente, subtraída da respectiva área da hemiarcada contralateral normal, não-tratado próprio do animal. Todos os valores de área obtidos foram comparados a outro previamente conhecido ( $0,25 \times 0,25 \text{ mm}^2$ ), utilizando o software ImageJ®.

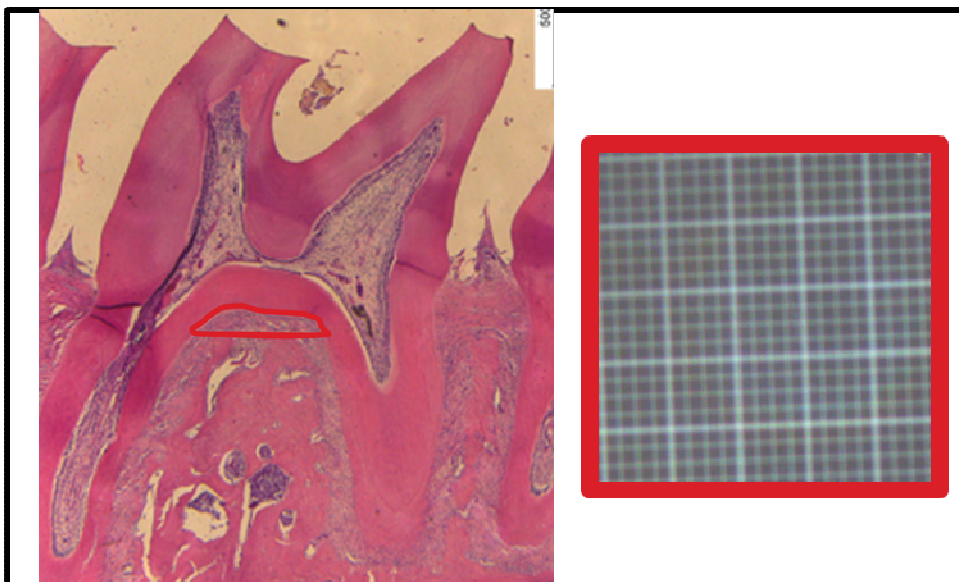
#### B) *Análise histométrica do osso alveolar*

O tecido ósseo da região de furca do segundo molar foi avaliado por análise histométrica utilizando o método descrito por (MARQUES et al., 2005), com adaptações. O mesmo protocolo de indução da perda óssea foi novamente realizado em todos os grupos experimentais. Após sacrifício no 11º dia, as maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10% tamponado por 24 horas. A seguir, as hemiarcadas desafiadas ou contralaterais normais foram submetidas à desmineralização com EDTA a 10%, por aproximadamente 30 dias. Posteriormente, as hemiarcadas foram suspensas em banho em água corrente por 24 horas e desidratadas em banhos sucessivos de etanol. As peças foram, então, incluídas em parafina para realização de cortes seriados de  $4 \mu\text{m}$  em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina e eosina (HE).

A área de perda óssea foi calculada traçando-se uma linha paralela ao teto da região de furca no ponto mais alto da borda óssea remanescente a partir de imagens obtidas em microscópio óptico. A área foi mensurada utilizando o software ImageJ® (ImageJ, 1.44p, National Institute of Health; EUA). As

imagens obtidas foram comparadas com uma área previamente conhecida (0,25x0,25 mm<sup>2</sup>) (Figura 6).

Figura 6 – Mensuração da perda óssea na região de furca por análise histométrica



A análise histométrica foi feita traçando-se uma linha paralela ao teto da região de furca no ponto mais alto da borda óssea remanescente a partir de imagens obtidas em microscópio óptico. A área foi mensurada utilizando o *software* ImageJ®. Todos os valores de área obtidos foram comparados a outro previamente conhecido (0,25 x 0,25 mm<sup>2</sup>), utilizando o *software* ImageJ®.

### C) *Análise histopatológica do osso alveolar*

A análise histopatológica foi realizada em cortes seriados da hemiarcada maxilar, utilizando as mesmas lâminas da análise histométrica. Para a análise histopatológica da hemiarcada, a região entre os 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> molares foi considerada, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular e de osteoclastos, além do estado de preservação do processo alveolar e do cimento, atribuindo-se escores entre 0 e 3, de acordo com a intensidade dos achados, como previamente descrito (LIMA et al., 2000):

**Escore 0:** Infiltrado celular ausente ou discreto; escassos ou raros osteoclastos; processo alveolar preservado; cimento preservado.

**Escore 1:** Infiltrado celular moderado; presença de alguns osteoclastos; pequena reabsorção do processo alveolar; cimento preservado.

**Escore 2:** Infiltrado celular acentuado; presença de grande número de osteoclastos; processo alveolar com reabsorção acentuada; destruição parcial de cimento.

**Escore 3:** Infiltrado celular acentuado; presença de um número aumentado de osteoclastos; processo alveolar ausente; destruição total do cimento.

#### D) Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e a sua atividade é considerada um marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. A atividade de mieloperoxidase foi determinada através do método colorimétrico em leitor de placas do tipo ELISA. Amostras de tecido gengival da região desafiada foram retiradas após o sacrifício (11º dia experimental) e armazenadas a -80 °C, utilizando a versão adaptada de Bradley *et al.*, 1982 (LIMA *et al.*, 2005). A gengiva da hemiarcada contralateral foi utilizada como não-tratado normal. Para a realização do ensaio, as amostras foram pesadas e incubadas em solução tampão gelada (NaCl 0,1 M, NaEDTA 0,012 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M; pH: 4.7) para posterior homogeneização utilizando um triturador (Pollytron). O homogenato foi centrifugado a 4 °C por 15 minutos (3000 rpm). O sedimento celular (*pellet*) foi então imerso em 1000 µl de solução hipotônica de NaCl (0,2%) e centrifugado novamente a 4 °C por 15 minutos. Em seguida, o pellet foi suspenso novamente em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH: 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. Após a homogeneização, a amostra foi centrifugada a 4 °C por 15 minutos (10000 rpm). Então, alíquotas de 50 µl da amostra foram colocadas em placas de 96 poços e em seguida adicionou-se em cada poço 25 µl de solução de 1,6 mM de 3',3',3,3-tetrametilbenzidina (TMB) e 100 µl de solução de 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, a placa foi incubada por 5 minutos a 37 °C, sendo a reação interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4M) ao fim deste período de tempo. A concentração de MPO foi determinada em absorbância de 450 nm. Os valores foram expressos como atividade de MPO por quantidade de tecido gengival, em relação a uma curva padrão de neutrófilos (> 90% de pureza), obtida através do ensaio de migração neutrofílica por injeção de carragenina (300 µg/animal) no peritônio de ratos.

#### *E) Avaliação da dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO)*

Antes da indução da perda óssea (dia zero), bem como na ocasião do sacrifício (dia 11) foram coletadas amostras de sangue do plexo orbital, utilizando capilares heparinizados. A atividade osteoblástica foi avaliada através da dosagem indireta da isoforma óssea da fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina óssea (FAO). A quantificação foi feita a segundo a metodologia da inativação térmica de amostras (MOSS; WHITBY, 1975), utilizando “kit” do fabricante LABTEST® (Labtest®, Lagoa Santa-MG, Brasil) conforme as instruções do fabricante. Esse método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea em altas temperaturas. Para tanto, alíquotas de 40 µl da amostra de plasma foram levadas ao banho-maria a 56 °C por 10 minutos, sendo em seguida colocadas em um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi obtida com espectrofotômetro com leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 405 nm. A fosfatase alcalina óssea foi determinada pela diferença da dosagem da fosfatase alcalina total (constituída pelas isoformas: hepática, entérica e óssea) subtraída da dosagem realizada com a amostra aquecida como previamente descrito (MOSS; WHITBY, 1975).

#### *F) Avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ por ELISA*

A produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi mensurada através da determinação da concentração dessas citocinas no sobrenadante do macerado do tecido gengival. No 11º dia experimental, os animais foram sacrificados e amostras do tecido gengival foram retiradas (hemiarçadas desafiada e contralateral) e armazenadas a -80 °C. As amostras do tecido foram colhidas, centrifugadas (1500g/10min.) e o procedimento de ELISA foi realizado como descrito a seguir: (1) Incubação com 2 µg/ml de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2) – 100 µl/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4° C; (2) lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; (3) bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 µl/poço por 2h à temperatura ambiente; (4) lavagem da placa (3x); (5) incubação com a curva padrão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 µl/poço por 16-24h à 4° C); (6) lavagem da placa (3x) (7) incubação com anticorpo biotilado (anticorpo de detecção)



diluído 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1 h à temperatura ambiente; (8) lavagem da placa (3x); (9) incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 µl/poço por 15 min à temperatura ambiente; (10) lavagem da placa (3x); (11) incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 µl/poço, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente; (12) a reação é parada com 150 µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M; (13) leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os resultados são expressos em µg/ml como a curva padrão.

### **3.4.1.2. Avaliação sistêmica**

A condição sistêmica dos animais foi avaliada através da análise da sobrevivência, leucograma, variação de massa corpórea, avaliação de alterações hepáticas, renais e esplênicas utilizando o índice do órgão e/ou dosagens bioquímicas (Figura 6).

#### *A) Sobrevivência*

A sobrevivência foi avaliada através da observação diária dos animais desde o início do protocolo experimental até o sacrifício (11<sup>o</sup> dia). Os dados foram expressos em porcentagem de animais vivos, utilizando a curva de Kaplan-Meier e o teste Log-rank (Mantel-Cox) para determinar a diferença entre as curvas.

#### *B) Variação de massa corpórea*

Todos os animais tiveram suas massas corpóreas medidas antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante os 11 dias seguintes do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g) em relação à massa inicial.

#### *C) Leucograma*

Os animais foram anestesiados com Hidrato de cloral (300 mg/kg; ip) e tiveram a ponta da cauda seccionada com uma tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Adicionalmente, outra gota de sangue foi colhida para a

confeção do esfregaço corado pelo método HE para as contagens diferenciais. A coleta de sangue foi realizada no dia 0 e na ocasião do sacrifício (11<sup>o</sup> dia).

#### *D) Avaliação hepática*

Amostras de sangue do plexo orbital foram coletadas antes da cirurgia para indução da perda óssea (dia 0) e por ocasião do sacrifício (dia 11), e as alterações hepáticas dos animais foram investigadas através da determinação da atividade sérica das enzimas transaminases (TGO e TGP). A quantificação foi realizada utilizando-se “kits” específicos para cada tipo de dosagem, seguindo a metodologia do laboratório fabricante (LABTEST®). Alíquotas de 50 µl da amostra foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 60 minutos para TGO e 30 minutos para TGP, em seguida foram adicionados 250 µl do reagente de cor e 2,5 ml de solução NaOH. Posteriormente, determinou-se diretamente em espectrofotômetro a leitura das absorbâncias utilizando comprimento de onda de 505 nm. No sacrifício, o fígado dos animais foi removido e pesado. Os valores foram expressos como o índice do respectivo órgão (peso úmido do órgão dividido pelo peso do animal no dia do sacrifício) (SILVA et al., 2010).

#### *E) Avaliação renal*

Amostras de sangue do plexo orbital foram coletadas antes da cirurgia para indução da perda óssea (dia zero) e por ocasião do sacrifício (dia 11) dos animais, e as alterações renais dos animais investigadas através da determinação da atividade sérica de ureia e creatinina, além do índice do órgão. A quantificação foi realizada utilizando-se “kits” específicos para cada tipo de dosagem, seguindo a metodologia do laboratório fabricante (LABTEST®). Para determinação dos níveis séricos de ureia, alíquotas de 10 µl da amostra foram adicionadas a 1 ml de urease tamponada e incubadas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 ml da solução oxidante e posteriormente determinou-se diretamente em espectrofotômetro a leitura das absorbâncias utilizando comprimento de onda de 600 nm.

Para determinação dos níveis séricos de creatinina, alíquotas de 125 µl da amostra foram adicionadas a 250 µl de ácido pícrico e 1 ml de solução tampão. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Após esse período realizou-se a primeira leitura em espectrofotômetro

com comprimento de onda de 510 nm. Em seguida, adicionou-se 50 µl de solução acidificante para a realização de uma nova leitura das absorvâncias. No sacrifício, o rim dos animais foi removido e pesado. Os valores foram expressos como o índice do respectivo órgão (peso úmido do órgão dividido pelo peso do animal no dia do sacrifício) (SILVA et al., 2010).

#### *F) Avaliação esplênica*

No sacrifício, o baço dos animais foi removido e pesado. Os valores foram expressos como o índice do respectivo órgão (peso úmido do órgão dividido pelo peso do animal no dia do sacrifício) (SILVA et al., 2010).

### **3.5. Análise estatística**

Os dados paramétricos foram expressos como Média±EPM. A Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni, foi utilizada na comparação entre os grupos.

Os dados não paramétricos foram expressos como Mediana acompanhada de valores extremos e os testes estatísticos aplicados foram o de Kruskal-Wallis e Dunn. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da perda óssea alveolar em modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos

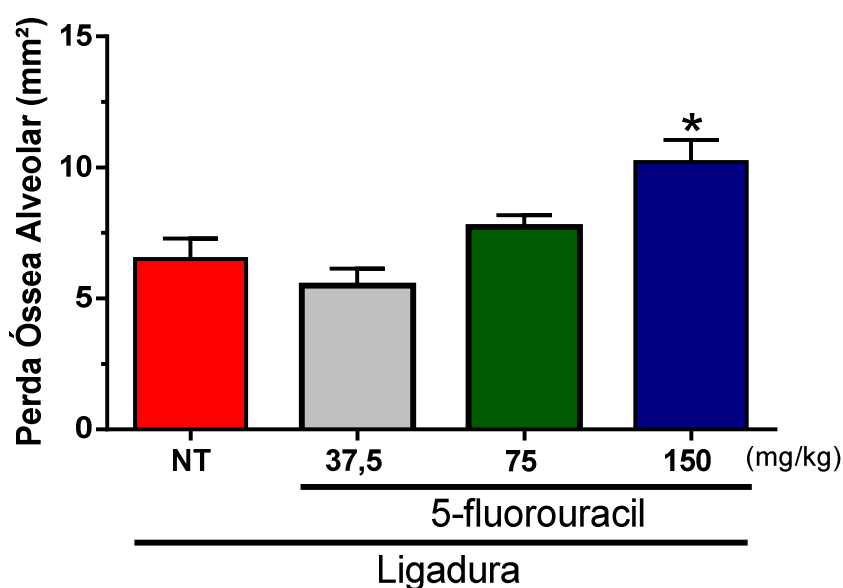
#### 4.1.1 Avaliação do tecido periodontal e atividade osteoblástica

##### A) Análise morfométrica do tecido ósseo alveolar

A colocação da ligadura promoveu a reabsorção do osso alveolar em animais do grupo não-tratado após 11 dias ( $6,50 \pm 0,79 \text{ mm}^2$ ). Nos grupos que receberam 5-FU, a perda óssea alveolar também ocorreu que receberam 5-FU nas doses de 37,5 ( $5,49 \pm 0,65 \text{ mm}^2$ ), 75 ( $7,72 \pm 0,45 \text{ mm}^2$ ) e 150 mg/kg ( $10,20 \pm 0,85 \text{ mm}^2$ ), sendo que, nos animais que receberam a maior dose, houve um aumento significativo em relação ao grupo não-tratado ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

O aspecto macroscópico das hemiarcadas maxilares pode ser evidenciado na figura 8, onde se observa a hemiarcada normal, onde não foi realizada ligadura (A), a hemimaxila tratada do grupo não-tratado (B) e a dos grupos tratados com 5-FU nas doses de 37,5 (C), 75 (D) e 150 mg/kg (E).

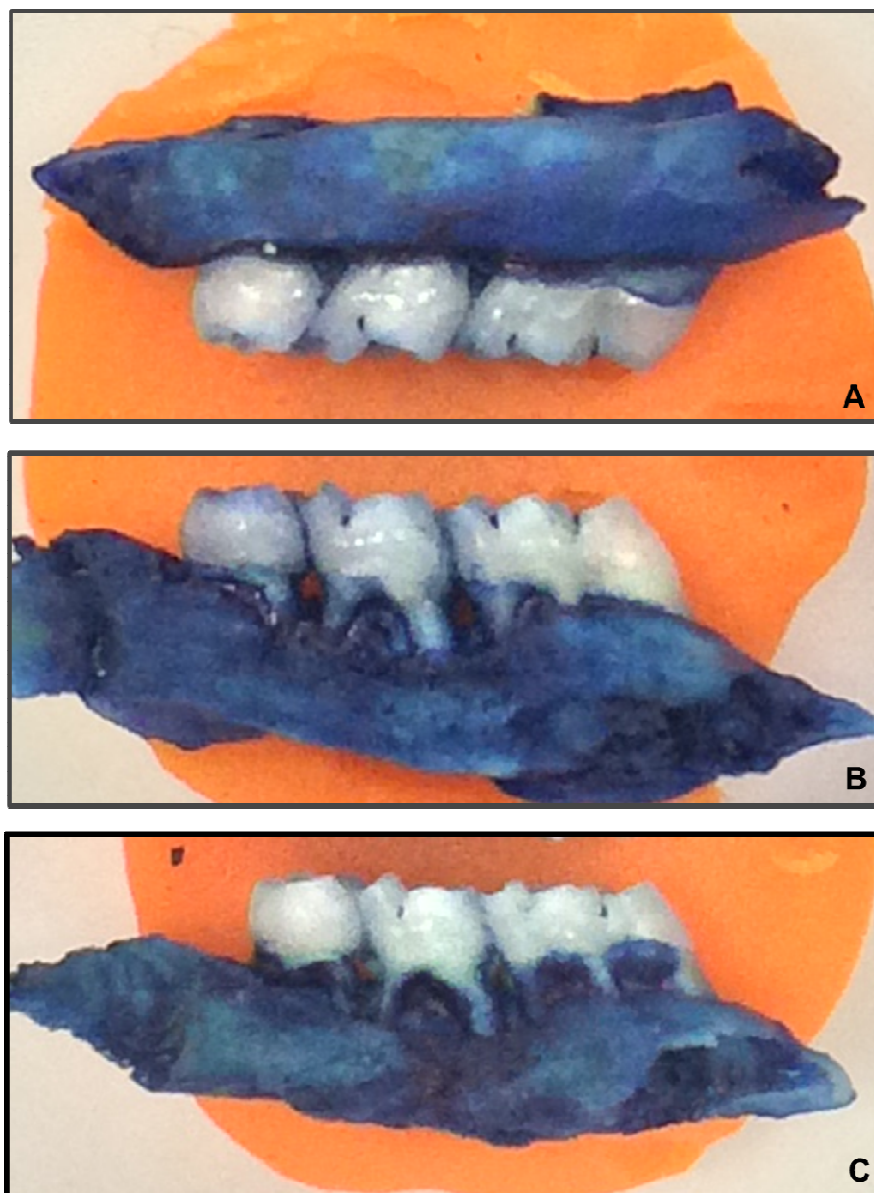
Figura 7 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.

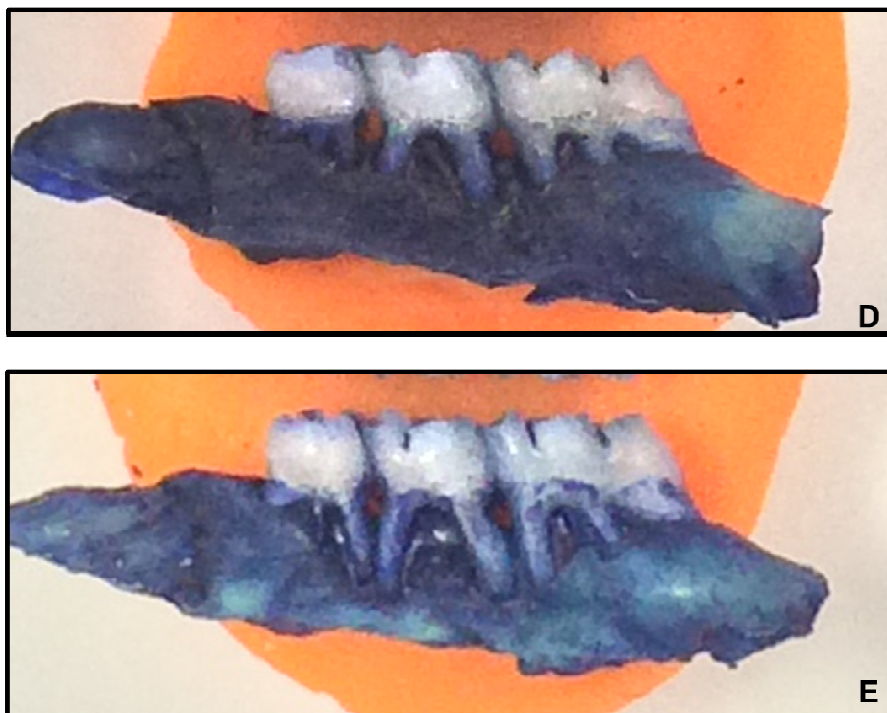


A colocação da ligadura promoveu perda óssea alveolar após 11 dias. As barras representam os valores obtidos na análise morfométrica, sendo eles expressos em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$

indica diferença estatística entre o grupo dos animais que receberam 5-FU na dose de 150 mg/kg e o grupo não-tratado (ANOVA; Bonferroni).

Figura 8 - Aspecto macroscópico do periodonto de ratos normais (a) ou submetidos à reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura – não-tratado (b) ou 5-FU 37,5 (c), 75 (d) e 150 (e).





(A): periodonto de animal que recebeu água destilada e não foi submetido à colocação da ligadura (normal). (B): periodonto de animal do grupo não-tratado, mostrando destruição do osso alveolar e exposição das raízes. (C), (D) e (E): periodonto de ratos que receberam 5-FU nas doses de 37,5, 75 e 150, respectivamente, mostrando destruição do osso alveolar e exposição das raízes, quadro que se mostra exacerbado na maior dose utilizada (150 mg/kg).

### *B) Análise histométrica do osso alveolar*

A colocação da ligadura promoveu um aumento na reabsorção do osso alveolar na região de furca em relação ao grupo normal (Normal= $0,05 \pm 0,005$  mm<sup>2</sup>; NT= $0,50 \pm 0,04$  mm<sup>2</sup>) ( $p < 0,05$ ). Esse aumento também foi observado nos animais que receberam 5-FU nas doses de 75 ( $0,60 \pm 0,10$  mm<sup>2</sup>) e 150 mg/kg ( $1,34 \pm 0,19$  mm<sup>2</sup>) ( $p < 0,05$ ). Os animais que receberam a maior dose do fármaco apresentaram maiores valores de histometria quando comparados ao grupo NT ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

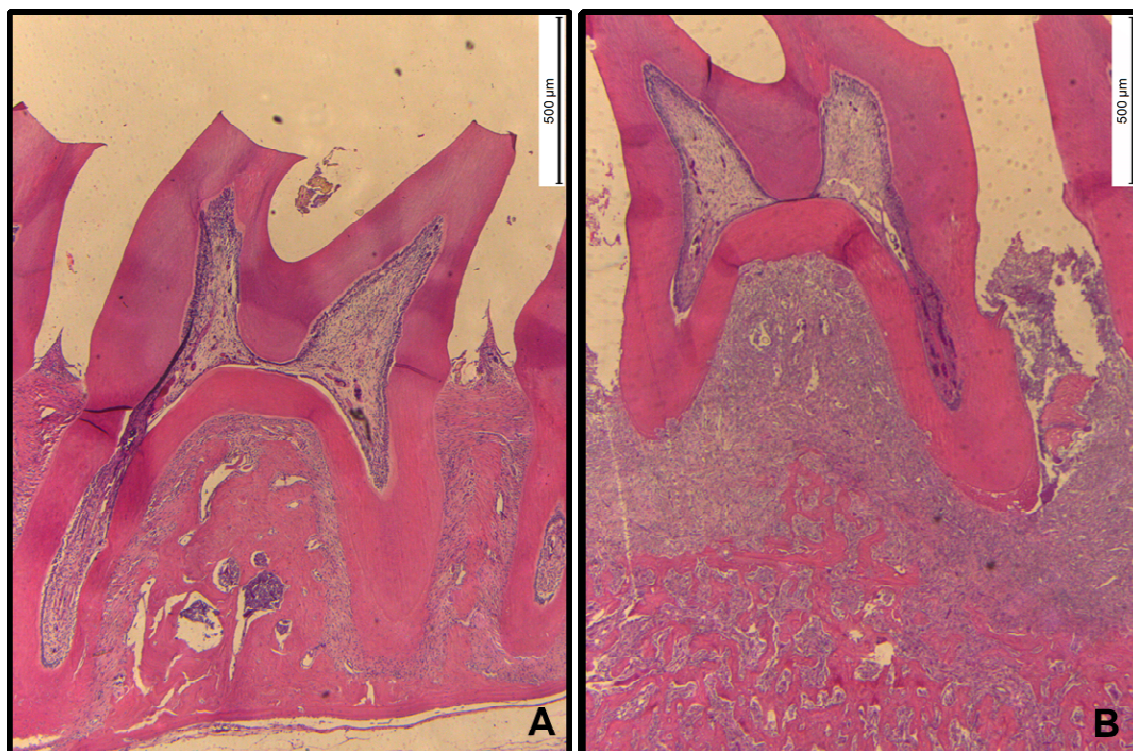
O aspecto do osso alveolar da região de furca pode ser observado na Figura 9. A colocação da ligadura promove uma diminuição do tecido ósseo na região de furca. A administração de 5-FU potencializou esse processo, principalmente no grupo que recebeu a maior dose, cujo aspecto evidenciou uma grande desorganização do tecido ósseo da região, com áreas de sequestros ósseos.

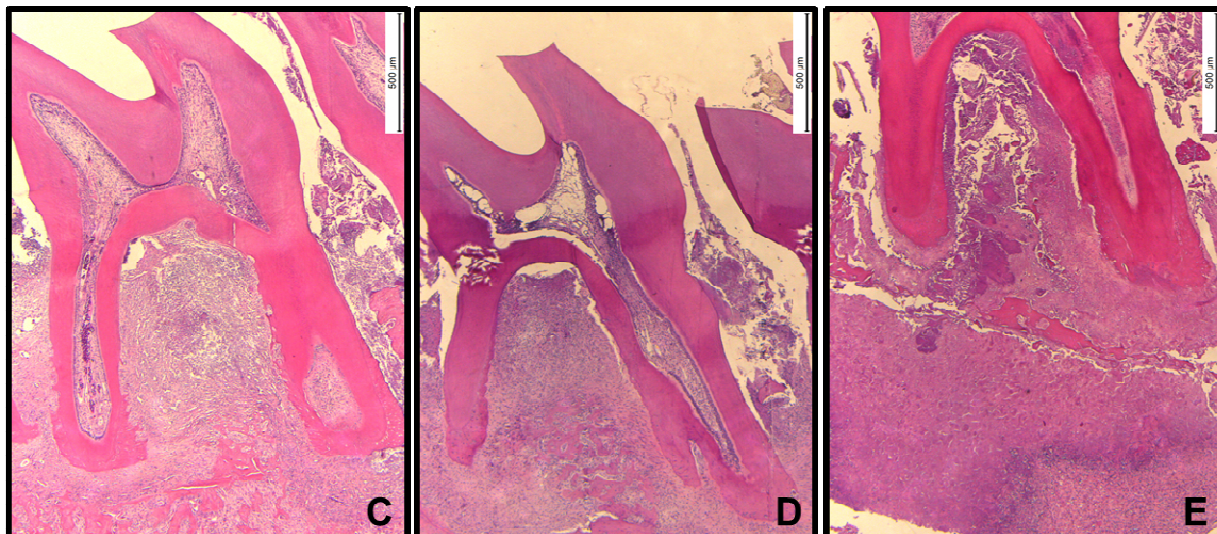
Tabela 1 - Avaliação histométrica do efeito do 5-FU na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura.

| Histometria<br>(mm <sup>2</sup> ) | Normal     | Não-tratado            | 5-FU       |                        |                         |
|-----------------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|-------------------------|
|                                   |            |                        | 37,5 mg/kg | 75 mg/kg               | 150 mg/kg               |
|                                   | 0,05±0,005 | 0,50±0,04 <sup>#</sup> | 0,40±0,14  | 0,60±0,10 <sup>#</sup> | 1,34±0,19 <sup>#*</sup> |

A colocação da ligadura promoveu um aumento na perda óssea da região de furca quando comparada com o grupo normal. Os valores obtidos na análise histométrica foram expressos em média±EPM. <sup>#</sup>p<0,05 representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos NT, 5-FU 75 e 150 em relação ao normal; \*p<0,05 indica diferença estatística entre o grupo dos animais que receberam 5-FU na dose de 150 mg/kg e o NT (ANOVA; Bonferroni).

Figura 9 - Fotomicrografias evidenciando o efeito do 5-FU na perda óssea da área de furca do segundo molar superior de ratos submetidos à reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura.





Na fotomicrografia A, observa-se o aspecto da região de furca de um rato normal, com presença do osso alveolar íntegro. A colocação da ligadura promoveu um aumento na perda óssea da região de furca dos ratos do grupo NT (B). A administração de 5-FU exacerbou a reabsorção óssea, sendo possível observar a presença de sequestros ósseos e desorganização da estrutura óssea, principalmente no grupo que recebeu a maior dose [37,5 (C), 75 (D), 150 (E)].

### C) Análise histopatológica do osso alveolar

A análise histopatológica do tecido localizado na região entre o primeiro e o segundo molar de ratos do grupo NT mostrou presença de infiltrado inflamatório e destruição do cemento e processo alveolar, apresentando mediana de escore 3 (2-3) (Tabela 1). Esse quadro difere daquele observado nas hemiarquadas que não receberam a ligadura, cujo aspecto era de estruturas periodontais preservadas e ausência de infiltrado inflamatório, mediana de escore 0 (0-0) (Tabela 1) ( $p < 0,05$ ). Nos animais dos grupos que receberam 5-FU, houve um aspecto similar ao observado no grupo não-tratado, evidenciando grande destruição das estruturas de suporte do dente e presença de inflamação. Dentre os animais que receberam o fármaco, apenas o grupo 37,5 não foi estatisticamente diferente dos animais do grupo normal [2 (0-2)]. Os grupos 5-FU 75 e 150 apresentaram medianas de escore 3 (2-3) e 3 (3-3), respectivamente.

Na figura 10, é possível observar o efeito do 5-FU nas estruturas periodontais. Considerando o grupo normal, é possível observar a preservação das estruturas periodontais, com cemento e osso alveolar intacto. A colocação da ligadura promoveu um processo inflamatório que levou a destruição dos tecidos de suporte do dente. Nos animais que



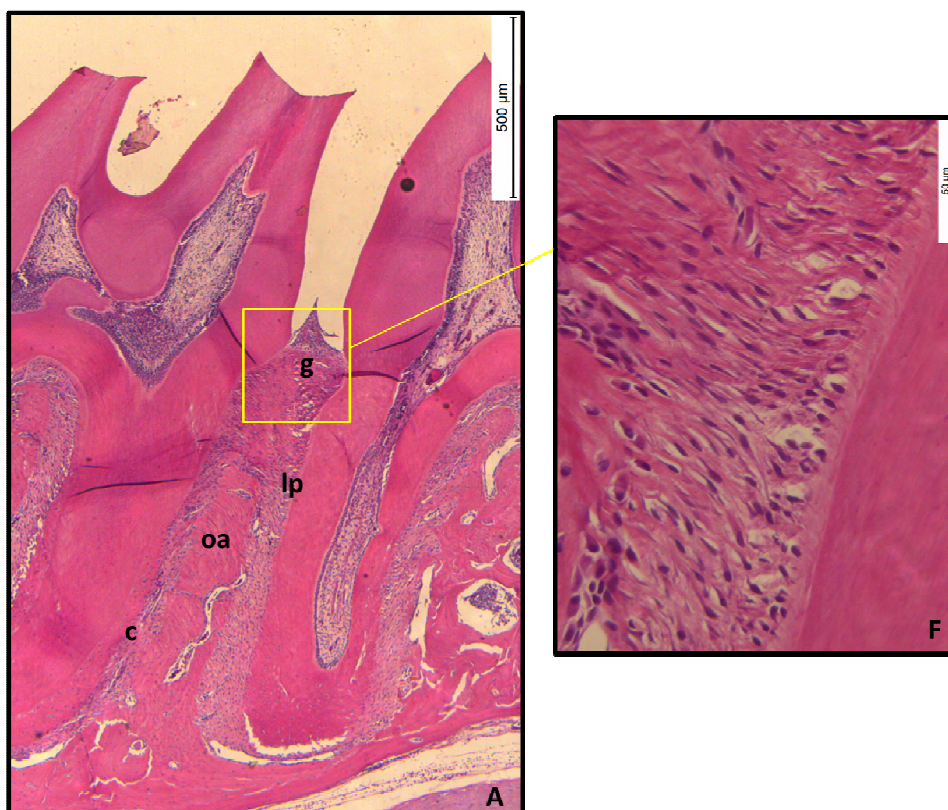
receberam 5-FU em suas maiores doses (75 e 150 mg/kg), também ocorreu um impacto sobre os tecidos do periodonto, com marcada presença de infiltrado inflamatório.

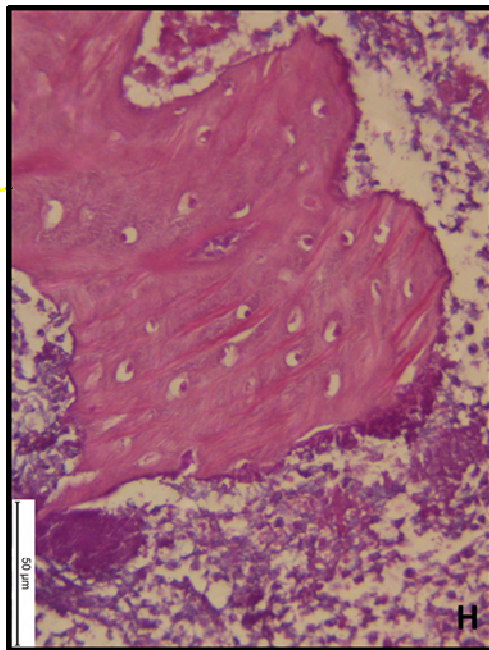
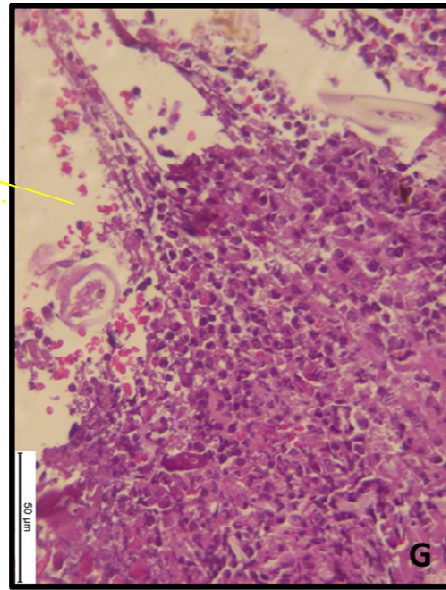
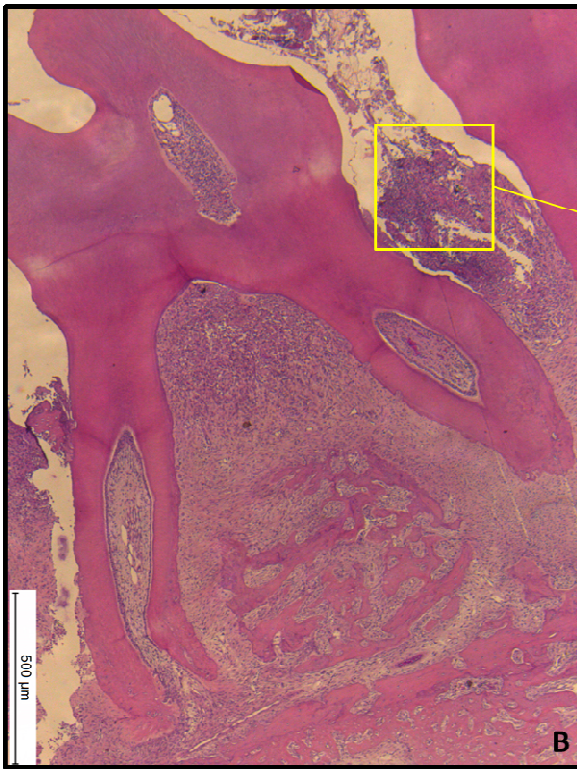
Tabela 02 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na análise histopatológica na periodontite induzida por ligadura em ratos.

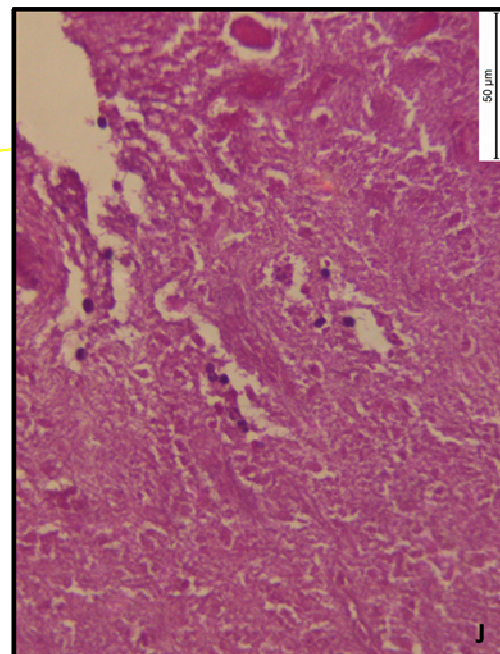
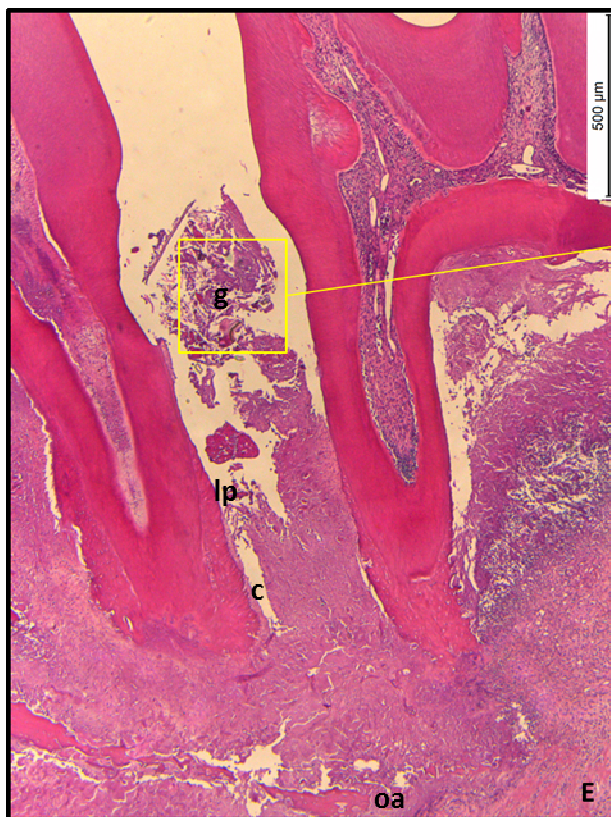
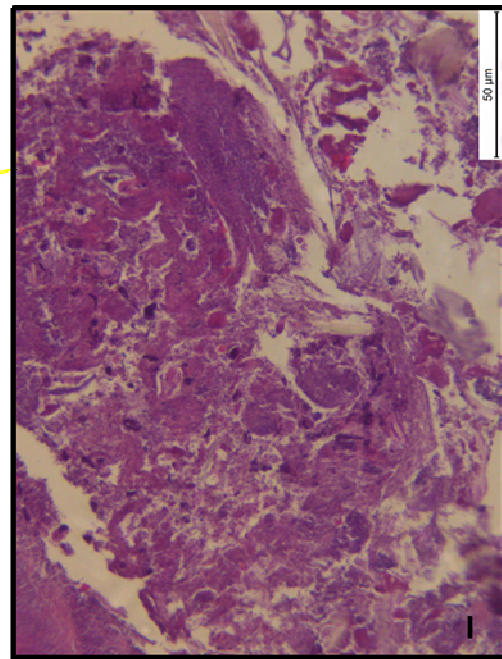
| Escore | Normal  | Não-tratado          | 5-FU       |                      |                      |
|--------|---------|----------------------|------------|----------------------|----------------------|
|        |         |                      | 37,5 mg/kg | 75 mg/kg             | 150 mg/kg            |
|        | 0 (0-0) | 3 (2-3) <sup>#</sup> | 2 (0-2)    | 3 (2-3) <sup>#</sup> | 3 (3-3) <sup>#</sup> |

A colocação da ligadura promoveu um aumento do infiltrado inflamatório e da destruição dos tecidos de suporte. Os dados representam valores de mediana (seguidos de seus valores extremos) relacionados a escores atribuídos às lâminas, que se referem à análise de parâmetros relacionados a integridade do tecido periodontal e a presença de infiltrado inflamatório na área. <sup>#</sup>p<0,05 representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos não-tratado, 5-FU 75 e 150 em relação ao normal (Kruskal-Wallis e Dunn).

Figura 10 - Fotomicrografias evidenciando o efeito do 5-FU sobre as estruturas periodontais de ratos submetidos à reabsorção óssea induzida por ligadura.







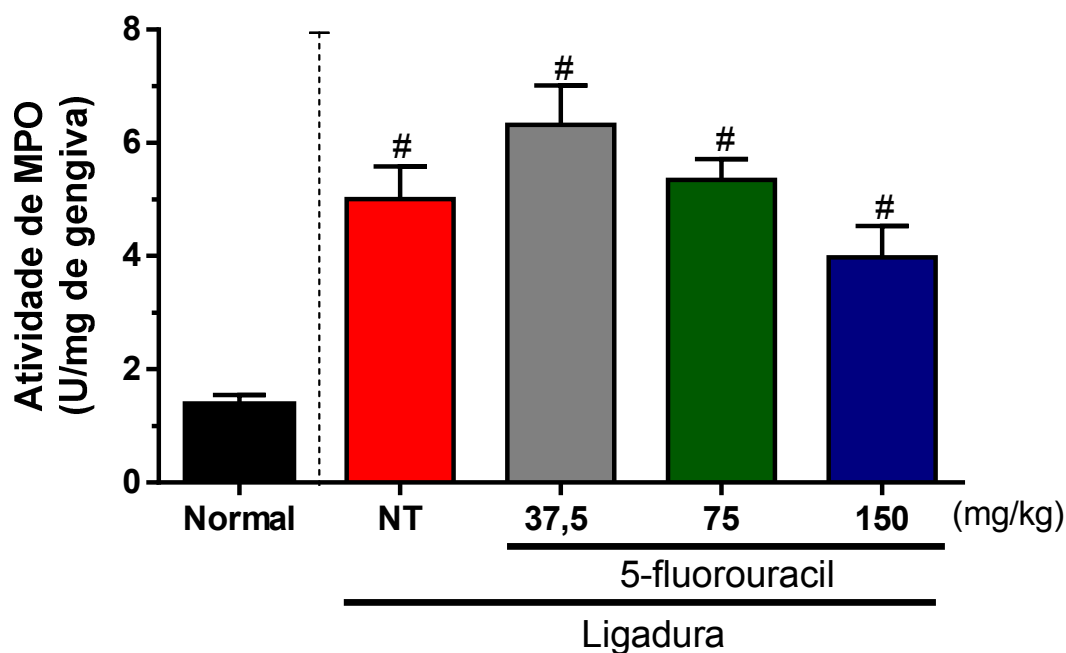
Nos animais do grupo normal é possível identificar as estruturas periodontais intactas e a ausência de infiltrado inflamatório (A e F). A colocação da ligadura promoveu a destruição dos tecidos periodontais, com instalação de processo inflamatório (Be G). Nos animais que receberam 5-FU nas maiores doses (75 e 150

mg/kg), foi possível observar um quadro exacerbado de inflamação e desorganização das estruturas periodontais [75 (D e I); 150 (E e J)]. Apenas o grupo que recebeu a dose de 37,5 mg/kg não apresentou diferença estatística em relação ao grupo normal. As áreas indicadas com as letras c, oa, lp e g significam, respectivamente, cemento, osso alveolar, ligamento periodontal e gengiva. A seta indica a região vista no maior aumento (aumento de 40x e 400x).

#### D) Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A colocação da ligadura ao redor do segundo molar dos ratos promoveu um aumento na atividade da enzima mieloperoxidase no tecido gengival quando comparado ao grupo normal, indicando presença de infiltrado neutrofílico no local do desafio (normal=1,38±0,16 U/mg; NT=5,00±0,57 U/mg) ( $p<0,05$ ) (Figura 11). Os animais tratados com 5-fluorouracil nas suas diferentes doses também apresentaram aumento na atividade da enzima [37,5 (6,32±0,69 U/mg); 75 (5,34±0,37 U/mg); 150 (3,97±0,56 U/mg)], contudo não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao NT ( $p>0,05$ ).

Figura 11 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na atividade de mieloperoxidase em tecido gengival na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.



Observou-se que os animais dos grupos que receberam 5-FU nas doses de 37,5, 75 e 150 mg/kg apresentaram atividade de mieloperoxidase aumentada quando comparados ao grupo normal, no 11º dia experimental, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo não-tratado. As barras representam os valores obtidos no ensaio, sendo eles expressos em

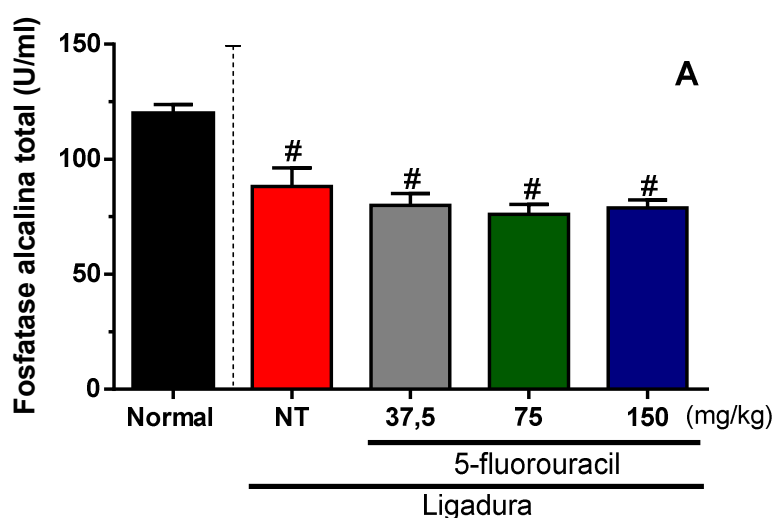
média±EPM. #p<0.05 indica diferença estatística do grupo dos animais que receberam 5-FU em suas diferentes doses e do grupo não-tratado em relação ao normal (ANOVA; Bonferroni).

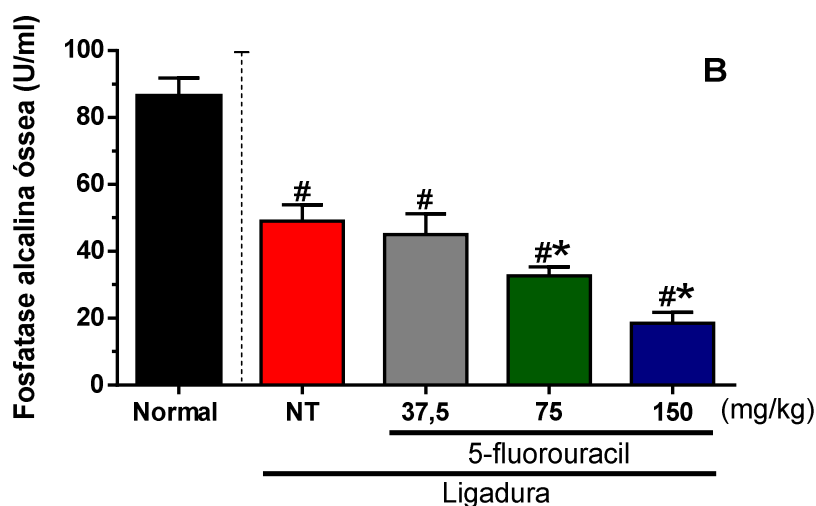
### E) Avaliação da dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

A colocação da ligadura proporcionou uma diminuição estatisticamente significativa na atividade sérica de Fosfatase Alcalina Total (FAT) em relação ao grupo normal [normal (119,70±4,10 U/ml); NT (88,16±8,03 U/ml)]. Dentre os grupos de animais que receberam 5-FU, observou-se também uma redução nos valores séricos de FAT [37,5 (79,89±5,20 U/ml); 75 (76,10±4,23 U/ml); 150 (78,75±3,58 U/ml)] (p<0,05) (Figura 12 A).

Em relação à Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), observou-se que a colocação da ligadura foi capaz de diminuir a atividade sérica dessa isoforma [normal (86,34±5,49 U/ml); NT (49,06±4,89 U/ml)] (p<0,05). Tal diminuição também foi observada em todos os grupos que receberam 5-FU [37,5 (45,01±6,20 U/ml), 75 (32,68±2,71 U/ml), 150 (18,48±3,28 U/ml)] (p<0,05) (Figura 12 B).

Figura 12 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre os níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total e Fosfatase Alcalina Óssea na periodontite por ligadura em ratos.





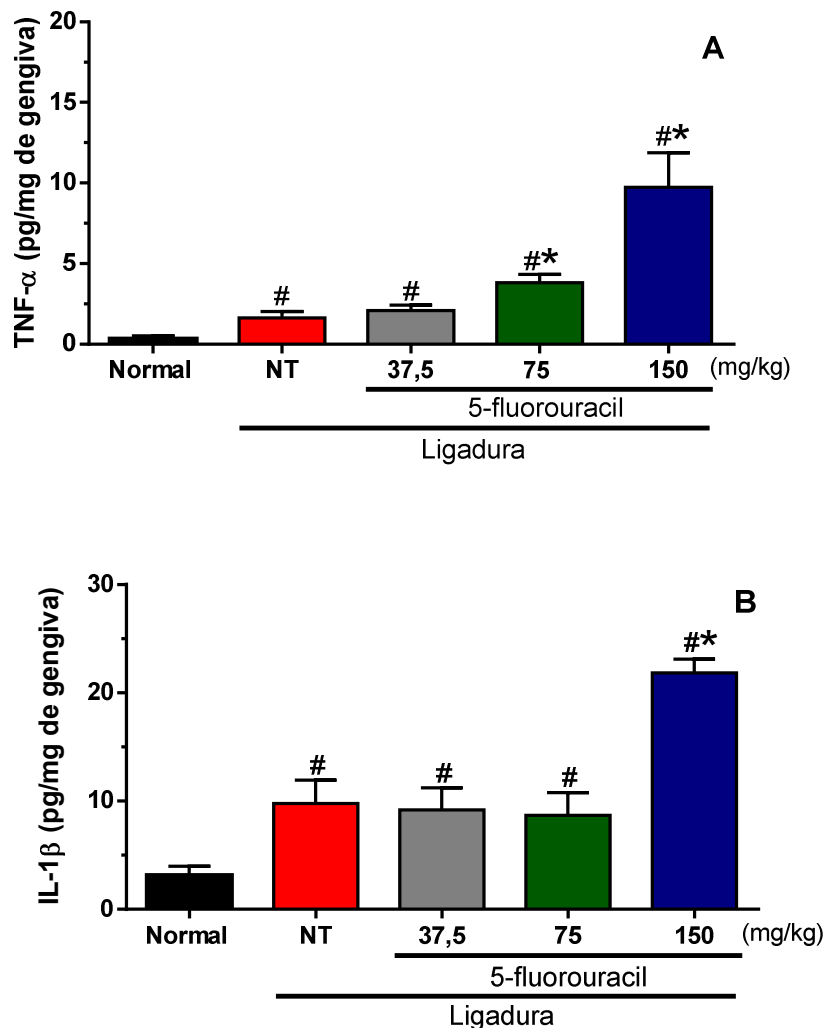
A colocação da ligadura foi capaz de promover a diminuição dos níveis séricos de FAT e FAO, o que também foi observado nos grupos que receberam 5-FU. As barras representam os valores obtidos no ensaio, sendo eles expressos em média±EPM.. # $p<0,05$  indica diferença estatística do grupo dos animais que receberam 5-FU em suas diferentes doses e do grupo não-tratado em relação ao grupo dos que receberam água destilada; \* $p<0,05$  indica diferença estatística entre os grupos dos animais que receberam o 5-FU e o não-tratado (ANOVA; Bonferroni).

#### F) Avaliação dos níveis de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ por ELISA

Em relação à expressão de  $TNF-\alpha$  no tecido gengival, observou-se que a colocação da ligadura induziu um aumento na quantificação desta citocina em relação ao lado não desafiado [normal ( $0,33\pm 0,19$  pg/mg); NT ( $1,63\pm 0,40$  pg/mg)] ( $p<0,05$ ). Nos animais que receberam 5-FU, também houve um acréscimo em relação ao grupo normal [37,5 ( $2,08\pm 0,34$  pg/mg)], sendo que nas doses de 75 ( $3,82\pm 0,52$  pg/mg) e 150 mg/kg ( $9,74\pm 2,14$  pg/mg) encontrou-se uma quantidade ainda maior, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos ratos do grupo NT ( $p<0,05$ ) (Figura 13 A).

A colocação da ligadura foi capaz de aumentar os níveis de  $IL-1\beta$  na gengiva desafiada ( $9,77\pm 2,16$  pg/mg) em relação ao tecido normal ( $3,12\pm 0,85$  pg/mg) ( $p<0,05$ ). Esse aumento também foi observado nos animais que receberam 5-FU [37,5 ( $9,18\pm 2,06$  pg/mg); 75 ( $8,68\pm 2,09$  pg/mg)] ( $p<0,05$ ). Nos ratos que receberam 5-FU na dose de 150 mg/kg ( $21,84\pm 1,26$  pg/mg), observou-se uma maior presença da citocina quando comparada aos animais do grupo NT ( $p<0,05$ ) (Figura 13 B).

Figura 13 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) na expressão de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.



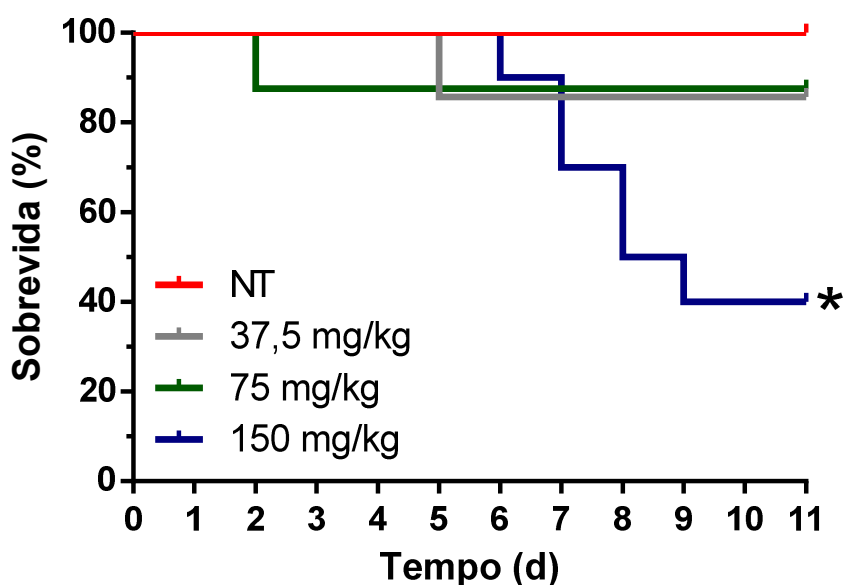
A colocação da ligadura promoveu um aumento na concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na gengiva. A administração de 5-FU nas doses de 75 foi capaz de aumentar a quantidade de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo não-tratado. Apenas os animais do grupo 150 mostraram aumento estatisticamente significativo em ambas as citocinas quando comparados ao grupo não-tratado ( $p < 0,05$ ). As barras representam os valores obtidos no ensaio, sendo eles expressos em média  $\pm$  EPM. # $p < 0,05$  indica diferença estatística do grupo dos animais que receberam 5-FU em suas diferentes doses e do grupo não-tratado em relação ao grupo normal; ## $p < 0,05$  indica diferença estatística entre os grupos dos animais que receberam o 5-FU e o não-tratado (ANOVA; Bonferroni).

### 3.1.1 Avaliação sistêmica

#### A) Sobrevida

Em relação à taxa de mortalidade, observou-se que os animais que receberam o 5-FU apresentaram uma menor sobrevida quando comparados ao grupo NT. O grupo que recebeu a dose de 150 mg/kg apresentou o menor valor de sobrevida (40%), seguido do grupo 75 (87,5%), do 37,5 (85,7%) e do NT (100%) (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) no percentual de sobrevida na reabsorção óssea induzida ligadura em ratos.



A colocação da ligadura não promoveu mortalidade entre os animais utilizados no estudo. Dentre os animais que receberam 5-FU, observou-se apenas diferença estatística apenas no grupo 150, quando comparados ao grupo não-tratado. Os dados foram expressos em porcentagem de animais vivos, utilizando a curva de Kaplan-Meier e o teste Log-rank (Mantel-Cox) para determinar a diferença entre as curvas.

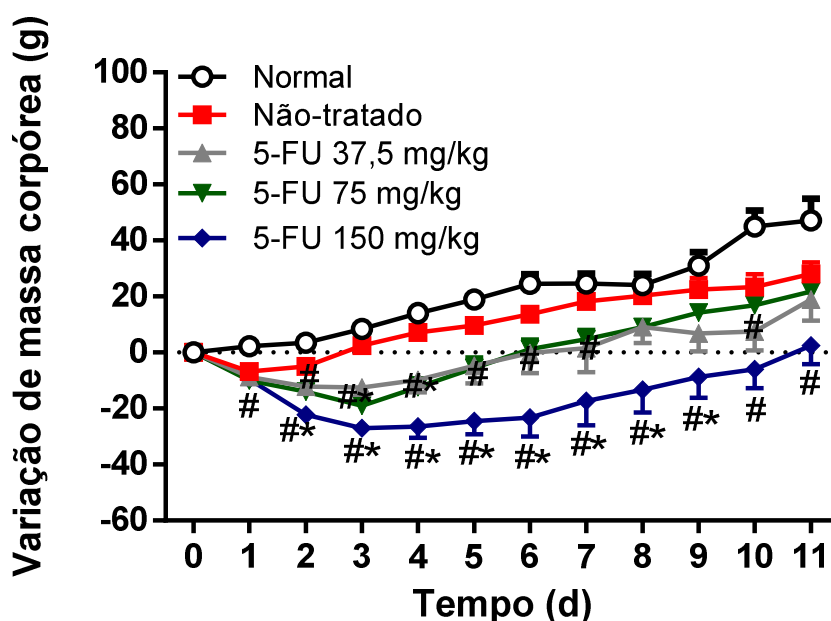
#### B) Variação de massa corpórea

Observou-se que, nos animais do grupo NT, houve uma perda de peso nos primeiros dois dias do experimento, apresentando diferença estatística em relação à curva de variação de massa dos animais normais ( $p < 0,05$ ). Em relação aos ratos que receberam 5-FU, verificou-se que, ao contrário dos animais do grupo NT, a perda de peso destes foi progressiva, sendo que, apenas no 8º dia os animais dos grupos 37,5 e 75 conseguiram acompanhar a curva ponderal dos animais do grupo normal ( $p > 0,05$ ). No grupo de animais



que receberam 5-FU na dose de 150 mg/kg, observou-se uma intensa perda de peso até o 11º dia, quando comparado ao grupo normal ( $p < 0,05$ ) (Figura 14).

Figura 15 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre a variação de massa corpórea na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.



Observou-se perda de peso inicial nos animais do grupo não-tratado em relação ao grupo normal. Nos grupos de animais que receberam 5-FU, a perda de peso se mostrou prolongada em relação ao grupo NT, sendo que, na maior dose, esta foi maior em relação ao grupo normal até o dia 11 ( $p < 0,05$ ). Os pontos representam os valores obtidos no ensaio, sendo eles expressos em média  $\pm$  Epm.. # $p < 0,05$  indica diferença estatística do grupo dos animais que receberam 5-FU em suas diferentes doses e do grupo não-tratado em relação ao grupo normal; \* $p < 0,05$  indica diferença estatística do grupo de animais que receberam 5-FU em suas diferentes doses em relação ao grupo não-tratado (ANOVA; Bonferroni).

### C) Leucograma

A colocação da ligadura não foi capaz de alterar a contagem dos leucócitos totais em relação aos seus valores basais [normal ( $18,27 \pm 0,77 \times 10^3/\text{mm}^3$ ); não-tratado ( $24,52 \pm 3,82 \times 10^3/\text{mm}^3$ )]. A administração de 5-FU também não apresentou quaisquer efeitos nesse sentido [37,5 ( $25,15 \pm 2,08 \times 10^3/\text{mm}^3$ ); 24,19  $\pm 2,85 \times 10^3/\text{mm}^3$ ); 150 ( $19,23 \pm 2,34 \times 10^3/\text{mm}^3$ )] (Tabela 3).

Em relação à contagem de neutrófilos, encontrou-se um aumento provocado pela inserção da ligadura [normal ( $2,35 \pm 0,18 \times 10^3/\text{mm}^3$ ); não-tratado ( $4,46 \pm 0,74 \times 10^3/\text{mm}^3$ )], achado que também foi encontrado nos animais que receberam 5-FU na dose de 37,5 mg/kg ( $4,98 \pm 0,59 \times 10^3/\text{mm}^3$ )

( $p < 0,05$ ). Nos grupos de animais que receberam as maiores doses, não foi observada uma neutrofilia, sendo que, no grupo 150, encontrou-se neutropenia [75 ( $3,76 \pm 0,91 \times 10^3/\text{mm}^3$ ); 150 ( $0,44 \pm 0,17 \times 10^3/\text{mm}^3$ )] ( $p < 0,05$ ).

Não foram observadas diferenças nas contagens de mononucleares em nenhum dos grupos experimentais [normal ( $15,92 \pm 0,71$ ); não-tratado ( $20,05 \pm 3,14$ ); 37,5 ( $20,16 \pm 2,12$ ); 75 ( $20,43 \pm 2,04$ ); 18,78  $\pm 2,38$ ] ( $p > 0,05$ ).

Tabela 03: Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre a contagem de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.

|   | Normal         | Não-tratado                | 5-fluorouracil             |                |                             |
|---|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-----------------------------|
|   |                |                            | 37,5 mg/kg                 | 75 mg/kg       | 150 mg/kg                   |
| Leucócitos totais<br>( $10^3/\text{mm}^3$ ) | 18,3 $\pm$ 0,8 | 24,5 $\pm$ 3,8             | 25,1 $\pm$ 2,1             | 24,2 $\pm$ 2,9 | 19,2 $\pm$ 2,3              |
| Neutrófilos<br>( $10^3/\text{mm}^3$ )       | 2,3 $\pm$ 0,2  | 4,5 $\pm$ 0,8 <sup>#</sup> | 5,0 $\pm$ 0,6 <sup>#</sup> | 3,8 $\pm$ 0,9  | 0,4 $\pm$ 0,2 <sup>##</sup> |
| Mononucleares<br>( $10^3/\text{mm}^3$ )     | 15,9 $\pm$ 0,7 | 20,0 $\pm$ 3,1             | 20,2 $\pm$ 2,1             | 20,4 $\pm$ 2,0 | 18,8 $\pm$ 2,4              |

Não foram observadas alterações na contagem de leucócitos totais e mononucleares em nenhum dos grupos avaliados. Observou-se um aumento na contagem de neutrófilos nos grupos não-tratado e 37,5, enquanto no grupo 150 ocorreu neutropenia. As barras representam os valores obtidos no ensaio, sendo eles expressos em média $\pm$ EPM.. <sup>#</sup> $p < 0,05$  indica diferença estatística do grupo dos animais que receberam 5-FU em suas diferentes doses e do grupo não-tratado em relação ao grupo normal (ANOVA; Bonferroni).

#### D) Avaliação da função hepática e renal

Não foram observadas alterações hepáticas renais ou esplênicas em nenhum dos grupos, mesmo aqueles que receberam 5-FU em suas diferentes doses (37,5, 75 e 150 mg/kg). Os valores séricos de TGO [normal ( $3,46 \pm 0,05$  U/L); não-tratado ( $3,36 \pm 0,10$  U/L); 37,5 ( $4,10 \pm 0,08$  U/L); 75 ( $3,23 \pm 0,02$  U/L); 150 ( $3,72 \pm 0,08$  U/L)], TGP [normal ( $3,50 \pm 0,06$  U/L); não-tratado ( $3,36 \pm 0,10$  U/L); 37,5 ( $3,63 \pm 0,24$  U/L), 75 ( $3,17 \pm 0,27$  U/L); 150 ( $3,12 \pm 0,17$  U/L)], ureia [normal ( $44,95 \pm 1,14$  U/ml); não-tratado ( $44,61 \pm 6,13$  U/ml); 37,5 ( $37,72 \pm 2,18$  U/ml); 75 ( $43,88 \pm 2,75$  U/ml); 150 ( $41,85 \pm 2,39$  U/ml)]

e creatinina [normal ( $1,90 \pm 0,13$  mg/dl); não-tratado ( $1,68 \pm 0,40$  mg/dl); 37,5 ( $1,85 \pm 0,30$  mg/dl); 75 ( $1,76 \pm 0,19$  mg/dl); 150 ( $2,29 \pm 0,36$  mg/dl)] dos grupos de animais que receberam ligadura combinada ou não com a administração de 5-FU não apresentaram diferença em relação aos valores do grupo normal. Esses achados corroboram com o que foi observado nos índices hepático, renal e esplênico, que se mostraram inalterados após 11 dias de ligadura, mesmo com administração do fármaco.

Tabela 04 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre os níveis séricos de transaminases hepáticas, ureia, creatinina e índices de órgãos na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.

|                    | Normal          | Não-tratado    | 5-fluorouracil |                |                |
|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                    |                 |                | 37,5 mg/kg     | 75 mg/kg       | 150 mg/kg      |
| TGO (U/L)          | $3,46 \pm 0,05$ | $3,4 \pm 0,1$  | $4,1 \pm 0,1$  | $3,2 \pm 0,02$ | $3,7 \pm 0,08$ |
| TGP (U/L)          | $3,5 \pm 0,1$   | $3,4 \pm 0,1$  | $3,6 \pm 0,2$  | $3,2 \pm 0,3$  | $3,1 \pm 0,2$  |
| Ureia (U/ml)       | $44,9 \pm 1,1$  | $44,6 \pm 6,1$ | $37,7 \pm 2,1$ | $43,9 \pm 2,7$ | $41,8 \pm 2,4$ |
| Creatinina (mg/dl) | $1,9 \pm 0,1$   | $1,7 \pm 0,4$  | $1,8 \pm 0,3$  | $1,8 \pm 0,2$  | $2,3 \pm 0,4$  |
| Índice hepático    | -               | $3,7 \pm 0,3$  | $3,9 \pm 0,3$  | $3,8 \pm 0,3$  | $4,1 \pm 0,4$  |
| Índice renal       | -               | $0,4 \pm 0,02$ | $0,4 \pm 0,02$ | $0,4 \pm 0,02$ | $0,5 \pm 0,02$ |
| Índice esplênico   | -               | $0,3 \pm 0,02$ | $0,3 \pm 0,03$ | $0,3 \pm 0,01$ | $0,2 \pm 0,01$ |

A colocação da ligadura, combinada ou não com a administração de 5-FU, não foi capaz de alterar os níveis séricos de TGO, TGP, ureia e creatinina em relação ao grupo normal. Os índices hepático e esplênico também não se mostraram alterados quando comparados ao grupo NT ( $p > 0,05$ ; ANOVA; Bonferroni).

## 5 DISCUSSÃO

O 5-fluorouracil é um fármaco antimetabólito amplamente utilizado no tratamento de diferentes neoplasias malignas. Recentemente, ele tem demonstrado uma ação inibitória sobre o crescimento de ossos longos e na densidade mineral óssea em ratos jovens (NADHANAN et al., 2012; XIAN et al., 2004, 2006).

Considerando o importante papel do 5-FU no tratamento do câncer, utilizou-se o modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura baseado em LIMA *et al.* (2000,2004) para investigar uma possível ação do fármaco na perda óssea alveolar em ratos. As doses para administração do fármaco em nosso estudo foram escolhidas com base em Nadhanan *et al.* (2012), sendo que a dose de 150 mg/kg corresponde a 457 mg/m<sup>2</sup>, quantidade considerada bem tolerada e dentro da janela terapêutica (300-500 mg/m<sup>2</sup>, durante 5 dias)..

Neste estudo, observou-se que, após 11 dias de ligadura, o 5-FU, na dose de 150 mg/kg, foi capaz de exacerbar a perda óssea alveolar em animais submetidos à periodontite experimental de forma significativa quando comparado aos animais do grupo não-tratado. Os achados da análise macroscópica corroboraram com a histometria, que mostrou que o 5-FU nas doses de 75 e 150 mg/kg apresentaram uma maior área de reabsorção óssea na região de furca do segundo molar quando comparados com os grupos normal e não-tratado.

Esse achado está em conformidade com a literatura, já que diversos autores tem demonstrado que fármacos podem interferir na perda óssea observada no modelo de ligadura, de forma a potencializar ou inibir esse processo (AZOUBEL et al., 2007; BEZERRA et al., 2000; GOES et al., 2010, 2014; GURGEL et al., 2004; LIMA et al., 2000, 2004; MITSUTA; HORIUCHI; SHINODA, 2002).

A utilização de 5-FU em modelo de periodontite induzida por ligadura foi recentemente reportada na literatura. Garcia et al. (2014) administraram o fármaco nas doses de 80 e 40 mg/kg, no dia do procedimento e 48 horas após, respectivamente. Encontrou-se uma intensa destruição periodontal naqueles animais submetidos à indução de periodontite e que receberam o fármaco quando comparados aos do grupo controle. Ainda, houve uma importante perda no tecido ósseo da região de furca, com presença de um abundante infiltrado inflamatório na região e destruição completa do septo interradicular. Porém, quando administrado em ratos cujo periodonto não havia sido manipulado, o fármaco não promoveu

nenhuma alteração, sugerindo que o 5-FU não afeta os tecidos periodontais saudáveis (GARCIA et al., 2014).

Recentemente, a perda óssea tem sido relatada na literatura como um dos principais efeitos adversos da quimioterapia do câncer (EBELING et al., 1999; MCCLUNE et al., 2011). Quach *et al.* (2014) demonstraram que terapias mieloablativas em dose única foram capazes de promover perda óssea em camundongos de forma persistente por 14 dias quando comparadas ao grupo não-tratado. Ainda, o 5-FU, também na dose de 150 mg/kg, promoveu a diminuição da espessura do trabeculado ósseo da tíbia e da vértebra após 14 e 28 dias, respectivamente, da sua administração.

O efeito deletério do fármaco sobre a estrutura óssea foi relacionado ao aumento do *turnover* ósseo, evidenciado pela diminuição de P1NP, um marcador de formação óssea e pela diminuição da quantidade de RANKL em relação à OPG (QUACH et al., 2014). Além desses efeitos no metabolismo ósseo, o 5-FU é relacionado a um efeito apoptótico sobre osteoblastos e seus precursores, resultando em uma importante inibição do processo de aposição óssea (XIAN et al., 2004).

Outros agentes imunossupressores são relacionados ao aumento da reabsorção óssea. O metotrexato (MTX), um fármaco pertencente ao grupo dos antimetabólitos, foi associado ao aumento da apoptose de osteócitos e a uma maior marcação de osteoclastos positivos para TRAP (SHANDALA et al., 2012). Ainda, o MTX apresentou um efeito inibitório sobre a aposição óssea nos ossos longos (XIAN et al., 2007). Resultados conflitantes no que concerne à utilização do metotrexato em modelo de periodontite experimental podem ser encontrados na literatura. Em estudo utilizando modelo de ligadura, o fármaco promoveu intensa destruição óssea alveolar que perdurou por 9 semanas (YOSHINARI et al., 1994). Já em outro protocolo experimental, não foram encontradas diferenças significantes entre os animais que receberam apenas salina e aqueles tratados com MTX (VERZELETTI et al. 2007).

O 5-FU, por sua vez, também tem demonstrado um efeito inibitório sobre a formação óssea. Xian *et al.* (2004,2006) mostraram que o 5-FU na dose de 150 mg/kg foi capaz de promover a diminuição do crescimento dos ossos longos em decorrência de sua ação apoptótica sobre a cartilagem próxima a metáfise da tíbia, local de intensa atividade proliferativa. Apesar das diferenças no padrão de

crescimento dos ossos longos e da maxila, os nossos resultados sugerem que o 5-FU também é capaz de interferir com os mecanismos de remodelação óssea do osso formado. Assim como no trabalho de Quach *et al.* (2014), pode-se especular que o fármaco tenha interferido nos mecanismos de remodelação, promovendo um aumento da reabsorção óssea em detrimento da aposição e exacerbando a perda óssea decorrente da colocação da ligadura .

O modelo de ligadura é um método bastante difundido na literatura e é primordialmente utilizado em estudos sobre a periodontite, já que a perda óssea alveolar é um dos principais achados dessa patologia (LIMA *et al.*, 2000, 2004). A similaridade entre a anatomia do periodonto de ratos e humanos torna esses animais apropriados para a realização dessa técnica e os tornam úteis para a avaliação de aspectos da resposta do hospedeiro frente a patógenos e/ou terapias (KLAUSEN, 1991; OZ; PULEO, 2011).

Ao promover a ruptura do epitélio gengival, a colocação da ligadura atua como fator traumático, facilitando a entrada de bactérias nos tecidos periodontais. Adicionalmente, facilita o acúmulo de placa, promovendo liberação de toxinas e enzimas que podem ser danosas ao periodonto, exacerbando o processo (KUHR *et al.*, 2004; LIAO *et al.*, 2014).

Patógenos com maior virulência podem quebrar a barreira do epitélio gengival e promover a instalação de uma gengivite e, posteriormente, periodontite (BOSSHARDT; LANG, 2004). Algumas situações clínicas, como a administração de quimioterápicos, por exemplo, podem deixar a barreira epitelial ainda mais suscetível ao rompimento, facilitando a entrada de patógenos nos tecidos periodontais (SANAVI *et al.*, 1985). A perda óssea inflamatória oriunda da periodontite é desencadeada por uma resposta imune do hospedeiro frente a esse desafio microbiano, sendo influenciada por fatores ambientais e genéticos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Após o estímulo bacteriano, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , por exemplo) são liberadas e interferem no eixo RANK/RANKL/OPG, aumentando a quantidade de RANKL e, assim, induzindo a osteoclastogênese, com consequente reabsorção óssea (GARLET *et al.*, 2006).

Neste estudo, a perda óssea alveolar observada nas análises macroscópica e histométrica foram corroboradas pelos achados histopatológicos. Observou-se grande destruição dos tecidos de suporte do periodonto e presença acentuada de infiltrado inflamatório na região entre primeiro e segundo molar dos animais que

receberam 5-FU 75 e 150 mg/kg, assim como nos ratos não tratados. A administração de 5-FU potencializou a destruição das estruturas de suporte do dente, com extensa destruição do osso alveolar e grande desorganização tecidual. Esses grupos apresentaram mediana de escore 3, evidenciando a instalação do processo de reabsorção óssea característico da periodontite.

Esses achados corroboram com aqueles publicados por Garcia et al. (2014). Neste estudo, observou-se um severo processo inflamatório com desorganização das estruturas periodontais. O infiltrado inflamatório esteve aumentado em todo o período experimental e a reabsorção óssea destruiu completamente o osso alveolar, observando-se apenas a permanência do osso basal da mandíbula (GARCIA et al., 2014).

A perda óssea decorrente do modelo periodontite induzida por ligadura é ligada a instalação de um processo inflamatório. Os neutrófilos fazem parte do infiltrado responsável pela defesa inicial do organismo contra as bactérias encontradas no biofilme e que promovem a perda óssea resultante da periodontite (DELIMA; VAN DYKE, 2003). Nesse contexto, a MPO é um importante marcador na periodontite experimental, tendo sua expressão aumentada durante o processo inflamatório gerado após a indução da doença (LIMA et al., 2000). Ela é uma enzima produzida pelo neutrófilo, armazenada em seus grânulos azurófilos e liberada mediante a exposição a um patógeno (MIYASAKI, 1991). Sua presença tem sido relacionada com a piora do quadro inflamatório presente na doença periodontal, apresentando níveis diminuídos no fluido crevicular gengival após o tratamento dessa patologia (MARCACCINI et al., 2010).

Ainda não há um consenso sobre o efeito do 5-FU sobre a enzima mieloperoxidase. A administração de 5-FU tem sido relacionada a um aumento na atividade de MPO em diversos estudos (LEITÃO et al., 2007, 2008; LIMA et al., 2005; LINDSAY et al., 2010; MAUGER et al., 2007; PRISCIANDARO et al., 2011; SOARES et al., 2011; WRIGHT et al., 2009). Todavia, Akbiyik *et al.* (2001) relataram que o 5-FU foi capaz de inibir a atividade de MPO *in vivo* e *in vitro*, relacionando esse achado com uma maior suscetibilidade do paciente a infecções. Em nosso estudo, o fármaco não foi capaz de promover um aumento na atividade de MPO em ratos que foram submetidos a periodontite por ligadura, quando comparados ao grupo não-tratado.

O processo de remodelação óssea é mantido pelo equilíbrio entre reabsorção e aposição óssea. Quando esse equilíbrio é quebrado, podem-se observar alterações em marcadores bioquímicos, sejam eles indicativos de formação óssea como a osteocalcina e fosfatase alcalina total e/ou óssea ou de reabsorção óssea, como a hidroxiprolina (VIEIRA, 2007). Dessa maneira, um importante parâmetro a ser considerado no estudo da perda óssea induzida por ligadura é a quantificação da fosfatase alcalina total (FAT) e da sua isoforma óssea (FAO). Em nosso estudo, todos os grupos, inclusive o não-tratado, reduziram a quantidade de FAT e FAO quando comparados com o grupo normal.

Nossos resultados corroboram com o que é descrito na literatura. Goes *et al.* (2014) mostraram que o modelo de ligadura causa uma diminuição na isoforma óssea da fosfatase alcalina, quando comparado aos animais normais. A FAO é um marcador de formação óssea e, portanto, a sua diminuição indica um desequilíbrio no *turnover* ósseo, com maior reabsorção em detrimento de uma menor aposição de osso. Ela é uma enzima produzida por osteoblastos e intimamente ligada à sua atividade (MAGNUSSON *et al.*, 1999). Já as taxas de FAT são por vezes relacionadas ao prognóstico de cânceres ósseos e podem variar em resposta a quimioterapia (BRAMER *et al.*, 2005).

Apesar dessa importância clínica, não existem dados suficientes que possam relacionar a administração de 5-FU e os valores da FAT, tampouco de sua isoforma óssea. Em nosso estudo, observou-se diminuição nos valores séricos da isoforma óssea também nos grupos que receberam 5-FU em suas diferentes doses, evidenciando um processo de reabsorção óssea.

A presença de citocinas pró-inflamatórias é característica da instalação da doença periodontal. Nesse contexto, citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são frequentemente avaliadas em protocolos de indução de periodontite, como o modelo de ligadura (ASSUMA *et al.*, 1998; DELIMA *et al.*, 2001). Diversos estudos relacionam a perda óssea induzida por ligadura com a produção e liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , atribuindo a essas citocinas um papel importante no processo de osteoclastogênese (GRAVES *et al.*, 1998; KORNMAN *et al.*, 1997; MABILLEAU *et al.*, 2012; SALVI; BECK; OFFENBACHERT, 1998). Sabe-se ainda que a administração de antagonistas dessas citocinas resulta em uma importante inibição da resposta inflamatória e da reabsorção óssea subjacente a periodontite (ASSUMA *et al.*, 1998; DELIMA *et al.*, 2001; GRAVES *et al.*, 1998). Assuma *et al.* (1998), em



estudo utilizando *Macaca fascicularis*, observaram que a injeção de inibidores de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  diminuiu em 80% o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão periodontal, além de promover um decréscimo de 67% na formação de osteoclastos resultando em uma destruição óssea cerca de 60% menor do que a observada nos animais utilizados como não-tratado. Esses resultados podem ser explicados pelo papel das citocinas na osteoclastogênese, pois já se sabe que IL-1 $\beta$  medeia o efeito osteoclastogênico de TNF- $\alpha$  ao aumentar a expressão de RANKL por células estromais. Ainda, IL-1 $\beta$  tem um efeito adicional na reabsorção óssea ao estimular a diferenciação de precursores osteoclásticos (WEI et al., 2005).

Considerando o importante papel dessas citocinas na perda óssea inflamatória, realizamos a dosagem de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no sobrenadante do macerado do tecido gengival por ELISA. A colocação da ligadura promoveu aumento de ambas as citocinas quando comparado ao grupo normal. Esses resultados corroboram com o que é descrito na literatura, já que IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são citocinas frequentemente associadas ao quadro inflamatório subjacente à periodontite (ASSUMA et al., 1998; DELIMA et al., 2001; GASPERSIC et al., 2003; GRAVES et al., 1998; OATES; GRAVES; COCHRAN, 2002; ZHANG et al., 2004)

. Os animais que receberam 5-FU nas suas diferentes doses apresentaram um aumento nos valores de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido gengival quando comparados ao grupo normal. Ainda, o grupo que recebeu a maior dose (150 mg/kg) exibiu uma maior quantidade dessas citocinas quando comparado ao grupo que recebeu apenas não tratado. Considerando o papel das citocinas avaliadas na perda óssea causada pela ligadura, a administração de 5-FU a ratos que receberam ligadura pode ter promovido uma exacerbação no quadro de destruição periodontal pela maior produção de citocinas inflamatórias. Tanto TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são relacionadas com a osteoclastogênese, portanto, esse resultado sugere que uma maior atividade osteoclástica pode ter sido estimulada por essas citocinas.

O modelo de ligadura não promoveu, após 11 dias, o aumento nas contagens de leucócitos totais, nem de células mononucleares. Esses achados diferem do que é descrito na literatura por Lima *et al.* (2000,2004) e Goes *et al.* (2014), que relataram a ocorrência de leucocitose no 11º dia experimental. Ainda, observou-se aumento na quantidade de neutrófilos nos animais do grupo não-tratado quando comparados ao grupo normal. Esse achado corrobora com o estudo de Holzhausen

et al. (2002) que encontraram um aumento nas contagens de polimorfonucleares após a indução de periodontite experimental por ligadura.

A administração de 5-FU em animais que receberam a ligadura não foi capaz de alterar as contagens de leucócitos totais e mononucleares quando comparada com os animais do grupo normal. Em relação à contagem de neutrófilos, observou-se que, enquanto os animais que receberam a dose de 37,5 mg/kg apresentaram um aumento dessas células sanguíneas, a administração de 150 mg/kg do fármaco resultou em um marcante decréscimo na contagem de polimorfonucleares. Apesar da administração de 5-FU ter mostrado a capacidade de inibir a produção de células sanguíneas, pode-se especular que a menor dose utilizada no estudo não foi suficiente para reverter o aumento da contagem de neutrófilos promovido pela colocação da ligadura. Por outro lado, a maior dose utilizada teve o potencial de reverter a neutrofilia causada pela indução da periodontite, causando uma importante depleção no número de polimorfonucleares.

Em estudo de Garcia et al. (2014), a administração de 5-FU em ratos cuja doença periodontal não foi induzida foi capaz de uma diminuição na contagem total de leucócitos e no número de neutrófilos até o 7º dia experimental. Uma possível explicação para essa divergência seria a diferença no número de dias entre os dois protocolos experimentais, além da diferença nas doses utilizadas.

A diminuição da presença de neutrófilos foi semelhante àquela encontrada no estudos destes autores. A neutropenia pode ter diminuído sobremaneira as defesas do hospedeiro, piorando o quadro periodontal quando comparado aos animais do grupo controle e explicando a exacerbada destruição dos tecidos.(GARCIA et al., 2014). A diminuição na contagem de neutrófilos, seja causada por um fator externo ou genético, torna o paciente mais suscetível a infecções, causando uma maior destruição do que a encontrada em um indivíduo imunocompetente (HART; ATKINSON, 2007; VAN DYKE, 2007).

Efeitos tóxicos decorrentes da administração de 5-FU são extensamente relatados na literatura. No que concerne às toxicidades hematológicas, o Meta-Analysis Group of Cancer (1998) observou que o fármaco em questão promoveu neutropenia, principalmente quando era administrado em *bolus*. Em nosso trabalho, o 5-fluorouracil foi administrado de maneira semelhante, sendo injetado apenas uma vez no animal. Efeitos mieloablativos são frequentemente relacionados ao 5-FU, com inibição na produção de células hematopoiéticas (LORENZ et al., 1999). A queda na

contagem de neutrófilos é um importante efeito colateral da administração do 5-FU e uma das razões para a redução da dose utilizada no tratamento quimioterápico (LI et al., 2003).

Outra implicação da diminuição da contagem de neutrófilos é a piora do quadro periodontal que foi observada no grupo que recebeu a maior dose. Esses achados corroboram com os estudos de Sallay *et al.* (1982) e Sanavi *et al.* (1985) que mostraram a piora da progressão da periodontite experimental após a administração de um agente imunossupressor, a ciclofosfamida. Esse agravamento da destruição tecidual ocorreu graças à ruptura da barreira epitelial, que consiste em uma importante defesa dos tecidos periodontais frente às bactérias (SALLAY et al., 1982; SANAVI et al., 1985). Em estudo utilizando MTX, Yoshinari et al. (2004) observaram uma neutropenia resultante da administração do fármaco por nove semanas, que foi compatível com o quadro de intensa destruição das estruturas de suporte do dente.

Todos os animais do grupo não-tratado sobreviveram até o último dia experimental e esse resultado está de acordo com o que é descrito na literatura (AZOUBEL et al., 2007). A administração do 5-FU promoveu um aumento na taxa de mortalidade daqueles animais que receberam a ligadura quando comparado ao grupo não-tratado. A administração do fármaco em sua maior dose (150 mg/kg) promoveu um percentual de sobrevida de 40%. Aliado a esse dado, está o fato de que esses ratos apresentaram uma acentuada perda de peso e não conseguiram a curva ponderal do grupo normal.

O percentual de sobrevida dos animais que recebem 5-FU nesse modelo ainda não está estabelecido. Estudos utilizando o 5-fluorouracil para a indução de mucosite oral apresentam taxas que variam entre 46 e 74% (LOURY et al., 1999; SONIS et al., 1995, 1997). O 5-FU também é usado em modelos de indução de mucosite intestinal, principalmente em camundongos. Wu et al. (2011) encontrou uma taxa de sobrevivência ainda menor do que a do nosso estudo: 30%. Apesar da diferença de doses e de espécies utilizadas nos modelos, os autores são unânimes em sugerir que o efeito do fármaco sobre as células do trato gastrointestinal pode estar intimamente relacionado a uma menor sobrevida. A ocorrência de mucosite promove a quebra da barreira epitelial e facilita a translocação de bactérias para a corrente sanguínea (LOURY et al., 1999; SONIS et al., 1995, 1997; WU et al., 2011).

A colocação da ligadura *per se* é associada com a perda de peso encontrada nos primeiros dias. Esse resultado pode ser atribuído ao próprio traumatismo gerado pela passagem da agulha e colocação do fio, o que pode dificultar a alimentação no período que sucede o procedimento. Lima *et al.* (2000) observaram que os animais que receberam a ligadura perderam 10% do seu peso no primeiro dia, retornando ao peso inicial até o final do experimento. De maneira semelhante, Goes *et al.* (2014) relataram que os animais submetidos a colocação de ligadura apresentaram perda de peso nos três primeiros dias, apresentando uma curva com cinética semelhante ao dos animais do grupo normal até o último dia experimental. Esses achados corroboram com o padrão de perda de peso em animais que receberam somente a ligadura em nosso estudo.

A perda de peso é um dos efeitos adversos da quimioterapia do câncer. Takiguchi *et al.* (2001) atribuíram a diminuição do peso dos camundongos a administração de 5-FU. Ainda, os autores relacionaram a diminuição na ingestão de comida como um dos efeitos da droga no organismo (TAKIGUCHI *et al.*, 2001). Em outro estudo, o fármaco também interferiu no percentual de ganho de peso em ratos albinos, mesmo quando uma baixa dose (10 mg/kg) foi utilizada (EL-SAYYAD *et al.*, 2009). Esses estudos estão em conformidade com os nossos achados, já que o 5-FU mostrou uma influência significativa na variação de massa corpórea quando comparado com o não-tratado, mesmo na menor dose utilizada no estudo. A diarreia promovida pela administração de 5-FU é um importante efeito adverso que está intimamente ligado à desnutrição e perda de peso (KORNBLAU *et al.*, 2000; PETRELLI *et al.*, 1987).

Considerando os diversos efeitos colaterais associados à administração de quimioterápicos, inclusive o 5-FU, avaliamos se as doses utilizadas no estudo promoveram toxicidade hepática, renal ou esplênica. A colocação da ligadura não foi capaz de alterar a atividade das transaminases hepáticas (TGO e TGP), nem os valores de ureia e creatinina, marcadores da atividade renal. Corroborando com esses dados, não se observou nenhuma alteração nos índices dos órgãos (fígado, rim e baço). Esses achados estão em conformidade com o que é relatado na literatura (GOES *et al.*, 2014)

Apesar da mortalidade observada no grupo 150, a administração de 5-FU nas suas diferentes doses não promoveu toxicidade hepática, renal ou esplênica. El-Sayyad *et al.* (2009) mostraram que o 5-FU causa toxicidade nos hepatócitos,

interferindo a nível de ultraestruturas, como mitocôndria e retículo endoplasmático. É importante salientar que, no estudo em questão, o antineoplásico foi administrado durante 20 dias, com intervalo de 1 dia entre cada administração. Especulamos que, nas doses utilizadas em nosso estudo, não foi possível observar hepatotoxicidade, pois diferentemente do estudo de El-Sayyad *et al.*, o fármaco foi administrado em dose única, sendo insuficiente para a geração do dano.

Em suma, os dados apresentados sugerem que o 5-FU é capaz de piorar a progressão da perda óssea alveolar causada pelo modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos. Sugerimos que, ao promover o aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como o IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , o fármaco esteja envolvido na sinalização de osteoclastos, potencializando, assim, a reabsorção óssea. A imunossupressão, representada pela neutropenia, também pode estar relacionada com a piora do quadro periodontal, ao deixar o animal mais suscetível à ação de patógenos. Nosso estudo demonstrou, assim, que o antineoplásico piora a progressão da periodontite. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar de forma mais minuciosa os mecanismos moleculares dessa interação entre o fármaco e as células imunes, bem como uma possível ação direta do 5-FU sobre o osso.

## 6 CONCLUSÃO

A administração de 5-FU exacerbou a reabsorção óssea alveolar em modelo de ligadura. Esse efeito foi demonstrado pelas análises morfométrica, histométrica e histológica.

Observou-se ainda que o fármaco mostrou efeito sobre o processo inflamatório observado na periodontite experimental, proporcionando um aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na gengiva.

A utilização do fármaco em sua maior dose promoveu uma acentuada neutropenia e perda de peso. Não foram observadas alterações nas análises hepática, renal e esplênica.

## REFERÊNCIAS

American Cancer Society, 2010. Disponível em <http://www.cancer.org/aboutus/globalhealth/global-economic-cost-of-cancer-report>.

Acesso em 23 de junho de 2014.

ALMEIDA, V. L. DE et al. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO Vera Lúcia de Almeida, Andrei Leitão, Luisa del Carmen Barrett Reina, Carlos Alberto Montanari e Claudio Luis Donnici\*. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, p. 403–409, 1998.

AXMANN, R. et al. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 9, p. 2747–2756, 2009.

AZOUBEL, M. C. F. et al. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 117–125, 2007.

BARCELLOS-HOFF, M. H.; LYDEN, D.; WANG, T. C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 7, p. 511–8, jul. 2013.

BEKLEN, A. et al. MMPs, IL-1, and TNF are Regulated by IL-17 in Periodontitis. **Journal of dental research**, v. 86, n. 4, p. 347–351, 2007.

BEKLEN, A. et al. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 13, p. 425–431, 2008.

BELARDELLI, F.; FERRANTINI, M. Cytokines as a link between innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 201–208, 2002.

BEZERRA, M. M. et al. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Prevents Alveolar Bone Loss in. **Journal of periodontology**, n. June, p. 1009–1014, 2000.

BLACKWELL, K. A.; RAISZ, L. G.; PILBEAM, C. C. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 294–301, 2010.

BOSSHARDT, D. D.; LANG, N. P. CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE The Junctional Epithelium : from Health to Disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 2004, p. 9–20, 2004.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618–622, 1982.

BRAMER, J. A M. et al. Pre- and post-chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localised osteosarcoma. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2846–2852, 2005.

BRAUN, T.; SCHETT, G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. **Current osteoporosis reports**, v. 10, n. 2, p. 101–8, jun. 2012.

BRUNING, P. F. et al. Bone mineral density after adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer. **British journal of cancer**, v. 61, n. October 1989, p. 308–310, 1990.

BURT, B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. **Journal of periodontology**, v. 76, p. 1406–1419, 2005.

CANTLEY, M. D. et al. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 6, p. 532–541, 2011.

CHABNER, B. A.; JR, T. G. R. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. January, p. 65–72, 2005.

CHAKRAVARTI, A. et al. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1633–1644, 2009.

CHAMBRONE, L.; LIMA, L. A. P. A.; CHAMBRONE, L. A. Prevalência das Doenças Periodontais no Brasil. Parte II. 1993-2003. **Revista Odonto**, v. 16, n. 31, p. 69–76, 2003.

CORDIER, P.-Y. et al. 5-FU-induced neurotoxicity in cancer patients with profound DPD deficiency syndrome: a report of two cases. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 823–6, set. 2011.

CRAWFORD, J. M.; TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. **Journal of Periodontal Research**, v. 13, p. 316–325, 1978.

CROTTI, T. et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **Journal of periodontal research**, v. 38, n. 4, p. 380–387, 2003.

DE MOLON, R. S. et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **Journal of periodontology**, v. 85, n. March, p. 465–77, 2014.

DELIMA, A J. et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, p. 233–240, 2001.

DELIMA, A. J.; VAN DYKE, T. E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. **Periodontology 2000**, v. 31, p. 55–76, 2003.



DI PAOLA, R. et al. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of dental research**, v. 83, p. 343–348, 2004.

DI PAOLA, R. et al. Effects of etanercept, a tumour necrosis factor-alpha antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats. **British journal of pharmacology**, v. 150, p. 286–297, 2007.

DOMIN, B. A.; MAHONY, W. B.; ZIMMERMAN, T. P. Transport of 5-fluorouracil and uracil into human erythrocytes. **Biochemical pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 503–10, 3 ago. 1993.

DUSCHINSKY, R.; PLEVEN, E.; HEIDELBERGER, C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 16, p. 4559–4560, 1957.

EBELING, P. R. et al. Mechanisms of bone loss following allogeneic and autologous hemopoietic stem cell transplantation. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 3, p. 342–350, 1999.

EKE, P. I. et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 - 2012. **Journal of Periodontology**, p. 1–18, 2015.

EL-SAYYAD, H. I. et al. Histo- pathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5- FU) on the liver of male albino rats. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 5, n. 5, p. 466–473, 2009.

EVERTS, V. et al. The Bone Lining Cell : Its Role in Cleaning Howship ' s Lacunae and Initiating Bone Formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 1, p. 77–90, 2002.

FARBER, S. et al. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). **The New England Journal of Medicine**, v. 238, n. 23, p. 787–793, 1948.

GAFFEN, S. L.; HAJISHENGALLIS, G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. **Journal of dental research**, v. 87, n. 9, p. 817–828, 2008.

GARCIA, V. G. et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Supportive Care in Cancer**, 2014.

GARLET, G. P. et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: Patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 4, p. 738–747, 2005.

GARLET, G. P. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans through the

modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, p. 12–20, 2006.

GASPERSIC, R. et al. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of periodontal research**, v. 38, n. 2, p. 198–203, 2003.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Immunoregulatory control of Th1 / Th2 cytokine profiles in periodontal disease. v. 35, p. 21–41, 2004.

GEORGIU, K. R. et al. Methotrexate chemotherapy reduces osteogenesis but increases adipogenic potential in the bone marrow. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 3, p. 909–18, mar. 2012.

GOES, P. et al. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Brazilian dental journal**, v. 21, n. 3, p. 193–8, jan. 2010.

GOES, P. et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, p. 45–54, 2014.

GÓRSKA, R. et al. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. March, p. 1046–1052, 2003.

GRAVES, D. T. et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. **The Journal of periodontology**, v. 69, p. 1419–1425, 1998.

GRAVES, D. T. et al. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Frontiers in Oral Biology**, v. 15, p. 117–132, 2012.

GROSSI, S. G. et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. **The Journal of periodontology**, v. 66, p. 23–29, 1995.

GUO, Y. et al. Oral alpha-lipoic acid to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Supportive care in cancer**, v. 22, n. 5, p. 1223–31, maio 2014.

GURGEL, B. C. D. V. et al. Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats. **The Journal of periodontology**, v. 75, n. December, p. 1613–1618, 2004.

HART, T. C.; ATKINSON, J. C. Mendelian forms of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 45, p. 95–112, 2007.

HASSETT, M. J. et al. Frequency and cost of chemotherapy-related serious adverse effects in a population sample of women with breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 16, p. 1108–1117, 2006.

HAYASHI, F. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2660–2669, 2003.

HÉNIN, E. et al. Fractionation of daily dose increases the predicted risk of severe sorafenib-induced hand-foot syndrome (HFS). **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 287–97, fev. 2014.

HENRIKSEN, K. et al. Local communication on and within bone controls bone remodeling. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1026–33, jun. 2009.

HENRIKSEN, K. et al. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology--implications for future treatments of osteoporosis. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 1, p. 31–63, mar. 2011.

HERNÁNDEZ, M. et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. **Journal of dental research**, v. 90, p. 1164–1170, 2011.

HOLZHAUSEN, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **The Journal of periodontology**, v. 73, n. 9, p. 1030–1036, 2002.

HUANG, S. et al. Mast Cell Degranulation in Human Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 2, p. 1–11, 2012.

INCA, I. N. DE C. J. A. G. DA S. DE P. E V. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].

JENSEN, S. A.; SØRENSEN, J. B. 5-Fluorouracil-Based Therapy Induces Endovascular Injury Having Potential Significance To Development of Clinically Overt Cardiotoxicity. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 57–64, jan. 2012.

JIN, L.; SÖDER, B.; CORBET, E. F. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. **The Journal of periodontology**, v. 71, n. June, p. 929–939, 2000.

JIN, Q. et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **The Journal of periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1300–1308, 2007.

KANTARCI, A.; OYAIZU, K.; VAN DYKE, T. E. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. **The Journal of periodontology**, v. 74, n. 1, p. 66–75, 2003.

KAYAL, R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **BioMed Research International**, p. 1–12, 2013.

KINANE, D. F.; PRESHAW, P. M.; LOOS, B. G. Host-response: Understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions - Consensus of the

Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, p. 44–48, 2011.

KINGSLEY, P. A. et al. Detection of subclinical anthracycline induced cardiotoxicity in breast cancer survivors. **CHRISMED Journal of Health and Research**, v. 1, n. 1, p. 36–39, 2014.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **The Journal of periodontology**, v. 62, p. 59–73, 1991.

KORNBLAU, S. et al. Management of cancer treatment-related diarrhea: Issues and therapeutic strategies. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 19, n. 2, p. 118–129, 2000.

KORNMAN, K. S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, p. 72–77, 1997.

KRAMER, J. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. **The Journal of periodontology**, v. 78, n. June, p. 1083–1093, 2007.

KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **Journal of periodontal research**, v. 39, n. 2, p. 101–6, abr. 2004.

LEAL, A. S. M. et al. Association between Chronic Apical Periodontitis and Low-birth-weight Preterm Births. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 3, p. 353–357, 2015.

LEE, S.-J. et al. Bone destruction by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand-expressing T cells in chronic gouty arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 5, p. R164, 2011.

LEITÃO, R. F. C. et al. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, p. 603–612, 2007.

LEITÃO, R. F. C. et al. Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, p. 215–222, 2008.

LI, C.-P. et al. Concurrent chemoradiotherapy treatment of locally advanced pancreatic cancer: gemcitabine versus 5-fluorouracil, a randomized controlled study. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 57, n. 1, p. 98–104, 2003.

LI, Y. et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3839–48, 1 maio 2007.

LIAO, C. et al. Expression and distribution of TNF- $\alpha$  and PGE 2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 5, p. 412–416, 2014.

LIMA, V. et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European journal of oral sciences**, v. 108, n. 2, p. 123–9, abr. 2000.

LIMA, V. et al. Effects of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibitors Pentoxifylline and Thalidomide on Alveolar Bone Loss in Short-Term Experimental Periodontal Disease in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 1, p. 162–168, 2004.

LIMA, V. et al. Effects of the tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **European journal of oral sciences**, v. 113, n. 3, p. 210–7, jun. 2005.

LINDSAY, R. J. et al. Orally administered emu oil decreases acute inflammation and alters selected small intestinal parameters in a rat model of mucositis. **The British journal of nutrition**, v. 104, p. 513–519, 2010.

LOHINAI, Z. et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **British journal of pharmacology**, v. 123, p. 353–360, 1998.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–8, maio 2003.

LORENZ, M. et al. Cyclooxygenase-2 is essential for normal recovery from 5-fluorouracil-induced myelotoxicity in mice. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 10, p. 1494–1502, 1999.

LOURY, D. et al. Effect of local application of the antimicrobial peptide IB-367 on the incidence and severity of oral mucositis in hamsters. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 87, p. 544–551, 1999.

MA, Y. L. et al. Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1-38) in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 4047–4054, 2001.

MABILLEAU, G. et al. Depth and volume of resorption induced by osteoclasts generated in the presence of RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1 or LIGHT. **Cytokine**, v. 57, n. 2, p. 294–299, 2012.

MADIANOS, P. N.; BOBETSIS, Y. A.; KINANE, D. F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 57–71, 2005.

MAGNUSSON, P. et al. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 11, p. 1926–1933, 1999.

MAIOLI, T. U. et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 13, p. 6, jan. 2014.

MALET-MARTINO, M.; JOLIMAITRE, P.; MARTINO, R. The prodrugs of 5-fluorouracil. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 2, n. 2, p. 267–310, mar. 2002.

MARCACCINI, A. M. et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, p. 180–190, 2010.

MARQUES, M. R. et al. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 421–429, 2005.

MARTIN, T. J.; SIMS, N. A. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. **Trends in molecular medicine**, v. 11, n. 2, p. 76–81, fev. 2005.

MARTINEZ, J. M. et al. Mucositis care in acute leukemia and non-Hodgkin lymphoma patients undergoing high-dose chemotherapy. **Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, p. 1–7, 18 abr. 2014.

MAUGER, C. A. et al. Probiotic effects on 5-fluorouracil-induced mucositis assessed by the sucrose breath test in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 612–619, 2007.

MCCLUNE, B. L. et al. Screening, prevention and management of osteoporosis and bone loss in adult and pediatric hematopoietic cell transplant recipients. **Bone marrow transplantation**, v. 46, n. 1, p. 1–9, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. [s.l.: s.n.].

MITSUTA, T.; HORIUCHI, H.; SHINODA, H. Effects of bisphosphonates on alveolar bone resorption in experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 5, p. 479–486, 2002.

MIYASAKI, K. T. The Neutrophil: Mechanisms of Controlling Periodontal Bacteria. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 12, p. 761–774, 1991.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 61, n. 1, p. 63–71, 15 maio 1975.

NADHANAN, R. R. et al. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 302, n. 11, p. E1440–9, 1 jun. 2012.

NAKASHIMA, T. et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. **Nature medicine**, v. 17, n. 10, p. 1231–4, out. 2011.

NEWBY, A. C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, n. 12, p. 2108–14, dez. 2008.

NOMURA, M. et al. Irsogladine maleate reduces the incidence of fluorouracil-based chemotherapy-induced oral mucositis. **Annals of oncology**, v. 24, n. 4, p. 1062–6, abr. 2013.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, p. 275–283, 1998.

OATES, T. W.; GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. L. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 2, p. 137–143, 2002.

OGAWA, K. et al. A retrospective analysis of periodontitis during bevacizumab treatment in metastatic colorectal cancer patients. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 6, p. 1020–1024, 2013.

OLIVEIRA, S. H. P. et al. Neutrophil migration induced by IL-1beta depends upon LTB4 released by macrophages and upon TNF-alfa and IL-1beta released by mast cells. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 36–46, 2008.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

PACCOU, J. et al. Alterations in bone mineral density and bone turnover markers in newly diagnosed adults with lymphoma receiving chemotherapy: a 1-year prospective pilot study. **Annals of oncology**, v. 25, n. 2, p. 481–6, fev. 2014.

PAPAC, R. J. Origins of cancer therapy. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 74, n. 6, p. 391–8, 2002.

PELLETIER, M. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 335–343, 2014.

- PETRELLI, N. et al. A prospective randomized trial of 5-fluorouracil versus 5-fluorouracil and high-dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 10, p. 1559–1565, 1987.
- PRISCIANDARO, L. D. et al. Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. February 2015, p. 671–677, 2011.
- PROFF, P.; RÖMER, P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. **Clinical oral investigations**, v. 13, n. 4, p. 355–62, dez. 2009.
- QUACH, J. M. et al. Myelosuppressive therapies significantly increase pro-inflammatory cytokines and directly causes bone loss. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2014.
- RABER-DURLACHER, J. E. et al. Periodontal infection in cancer patients treated with high-dose chemotherapy. **Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 10, n. 6, p. 466–473, 2002.
- RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–8, 13 ago. 2010.
- RAVALD, N.; JOHANSSON, C. S. Tooth loss in periodontally treated patients. A long-term study of periodontal disease and root caries. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 1, p. 73–79, 2012.
- ROBLING, A. G. et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5866–75, 29 fev. 2008.
- RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis : III . The Utilization of Uracil-2-C14 by Preneoplastic Rat Liver and Rat Hepatoma Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis III . The Utilization of Uracil-2-C14 by Preneoplastic Rat Liver and Rat He. **Cancer research**, v. 14, p. 119–123, 1954.
- SAARTO, T. et al. Chemical castration induced by adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy causes rapid bone loss that is reduced by clodronate: A randomized study in premenopausal breast cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 4, p. 1341–1347, 1997.
- SALA, A.; BARR, R. D. Osteopenia and cancer in children and adolescents: the fragility of success. **Cancer**, v. 109, n. 7, p. 1420–31, 1 abr. 2007.
- SALLAY, K. et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **Journal of Periodontal Research**, v. 17, p. 263–274, 1982.



SALVI, G. E.; BECK, J. D.; OFFENBACHERT, S. PGE2, IL-1beta and TNF-alfa Responses in Diabetics as Modifiers of Periodontal Disease Expression. **Annals of Periodontology**, v. 3, n. 1, p. 40–50, 1998.

SANAVI, F. et al. The colonization and establishment of invading bacteria in periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. **The Journal of periodontology**, v. 56, n. 2, p. 273–280, 1985.

SATO, K.; TAKAYANAGI, H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, p. 419–426, 2006.

SCHWAB, M. et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. **Journal of clinical oncology**, v. 26, n. 13, p. 2131–8, 1 maio 2008.

SHANDALA, T. et al. The role of osteocyte apoptosis in cancer chemotherapy-induced bone loss. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 7, p. 2889–97, jul. 2012.

SHAPIRO, C. L.; MANOLA, J.; LEBOFF, M. Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 14, p. 3306–3311, 2001.

SILVA, L. M. C. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 5, p. 830–5, jan. 2010.

SIVENDRAN, S. et al. Metabolic complications with the use of mTOR inhibitors for cancer therapy. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 1, p. 190–6, fev. 2014.

SOARES, P. M. G. et al. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, p. 713–720, 2011.

SONIS, S. et al. Alteration in the frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v. 31, n. 4, p. 261–266, 1995.

SONIS, S. T. et al. Transforming growth factor-beta 3 mediated modulation of cell cycling and attenuation of 5-fluorouracil induced oral mucositis. **Oral oncology**, v. 33, n. 1, p. 47–54, 1997.

SWAMINATHAN, V. et al. Role of salivary epithelial toll-like receptors 2 and 4 in modulating innate immune responses in chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 48, p. 757–765, 2013.

TAKAHASHI, F. et al. Osteopontin is Strongly Expressed by Alveolar Macrophages in the Lungs of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Lung**, v. 182, n. 3, p. 173–185, ago. 2004.

TAKIGUCHI, N. et al. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: Evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, p. 11–14, 2001.

VAN DYKE, T. E. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 45, p. 10–13, 2007.

VAN KUILENBURG, A. B. P. et al. Increased dihydropyrimidine dehydrogenase activity associated with mild toxicity in patients treated with 5-fluorouracil and leucovorin. **European journal of cancer**, v. 43, n. 2, p. 459–65, jan. 2007.

VAN LEEUWEN, B. . et al. The effect of chemotherapy on the morphology of the growth plate and metaphysis of the growing skeleton. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 29, n. 1, p. 49–58, fev. 2003.

VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 75–82, 2007.

VOZZA, I. et al. Periodontal disease and cancer patients undergoing chemotherapy. **International Dental Journal**, v. 65, n. 1, p. 45–48, 2015.

WANG, C.-C. et al. Hemorrhagic cystitis in children treated with alkylating agent cyclophosphamide: The experience of a medical center in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, p. 1–7, 20 jul. 2013.

WEI, S. et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. v. 115, n. 2, 2005.

WRIGHT, T. H. et al. The herbal extract, Iberogast®, improves jejunal integrity in rats with 5-Fluorouracil (5-FU)-induced mucositis. **Cancer Biology and Therapy**, v. 8, n. January 2015, p. 923–929, 2009.

WU, Z. et al. Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-Fluorouracil in a mouse mucositis model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 5, p. 339–344, 2011.

XIAN, C. J. et al. Effects of acute 5-fluorouracil chemotherapy and insulin-like growth factor-I pretreatment on growth plate cartilage and metaphyseal bone in rats. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 739–49, set. 2004.

XIAN, C. J. et al. Damage and recovery of the bone growth mechanism in young rats following 5-fluorouracil acute chemotherapy. **Journal of cellular biochemistry**, v. 99, n. 6, p. 1688–704, 15 dez. 2006.

XIAN, C. J. et al. Folinic Acid Attenuates Methotrexate Damages on Bone Growth Mechanisms and Pools of Bone Marrow Stromal Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 214, n. 3, p. 777–785, 2007a.

XIAN, C. J. et al. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects. **Bone**, v. 41, n. 5, p. 842–50, nov. 2007b.

YOSHINO, F. et al. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e82834, jan. 2013.

YU, Y.-H. et al. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 42, n. 1, p. 21–28, 2015.

YUCEL-LINDBERG, T.; NILSSON, S.; MODÉER, T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in human gingival fibroblasts. **Journal of dental research**, v. 78, n. 1, p. 61–68, 1999.

ZHANG, X. et al. Short- and long-term effects of IL-1 and TNF antagonists on periodontal wound healing. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 5, p. 3514–3523, 2004.

ZHAO, C. et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. **Cell metabolism**, v. 4, n. 2, p. 111–21, ago. 2006.

**ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL -CEPA**

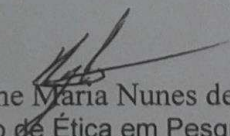
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 85/2013, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ATORVASTATINA E DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR LIGADURA E 5-FLUOROURACIL”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Vilma de Lima e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 19 de dezembro de 2013.

Fortaleza, 20 de dezembro de 2013

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA