

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
CLINICA INTEGRADA

SILVANA FREITAS DE SOUZA LEÃO

**EFEITO DO METOTREXATO EM ALTAS DOSES NA PROGRESSÃO DE LESÕES
PERIAPICAIS INFLAMATÓRIAS EM RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
IMAGINOLÓGICA**



RECIFE - PE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
CLINICA INTEGRADA

SILVANA FREITAS DE SOUZA LEÃO

**EFEITO DO METOTREXATO EM ALTAS DOSES NA PROGRESSÃO DE LESÕES
PERIAPICAIS INFLAMATÓRIAS EM RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
IMAGINOLÓGICA**

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Recife-PE

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L437e Leão, Silvana Freitas de Souza.
Efeito do metotrexato em altas doses na progressão de lesões periapicais inflamatórias em ratos: análise histológica e imaginológica / Silvana Freitas de Souza Leão. – 2015.
63 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Danyel Elias da Cruz Perez.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Inflamação endodôntica . 2. Lesões periapicais. 3. Metotrexato. 4. Ratos. I. Perez, Danyel Elias da Cruz (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2016-254)

SILVANA FREITAS DE SOUZA LEÃO

**EFEITO DO METOTREXATO EM ALTAS DOSES NA PROGRESSÃO DE LESÕES
PERIAPICAIS INFLAMATÓRIAS EM RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E
IMAGINOLÓGICA**

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

DATA DA APROVAÇÃO: 27 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

1º examinador : Profª Dra Monikelly do Carmo Chagas do Nascimento

2º examinador: Profª. Dra. Daniela da Silva Feitosa

3º examinador: Profª Dra. Andrea dos Anjos Pontual

4º examinador: Profª Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE REITOR

Vânia Pinheiro Ramos

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa. Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

MEMBROS COLABORADORES

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

*Dedico este trabalho aos meus PAIS **NARA e ERNESTO** pelo eterno carinho, compreensão e apoio em todas as fases da minha vida. Voçês são meu Porto seguro!*

*À minha irmã **Adriana**, eterna companheira, com a qual divido minhas emoções, críticas e o cotidiano familiar*

*A todos os meus **familiares** presentes e mesmo ausentes do meu convívio, minha sincera gratidão e reconhecimento*

AGRADECIMENTOS

Agradeço e louvo a **Deus** por me permitir estar aqui, concluindo mais esta etapa da minha vida.

Ao meu **orientador e professor Danyel Elias da Cruz Perez** pela maneira segura com que transmite seus conhecimentos, paciência e dedicação à docência. Parabéns por esse Dom de saber transmitir e compartilhar **Ciência** com os seus alunos! Guardarei comigo sempre todo esse aprendizado!

Ao médico veterinário **Edeones Tenório de França**, do Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE, meus sinceros agradecimentos pela incansável ajuda com os animais, ponto de partida para o êxito da pesquisa.

A **coordenadora do Curso de Pós Graduação em Odontologia** Dra Alessandra Albuquerque T. Carvalho e aos demais **professores do curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**, que contribuíram sobremaneira para a realização deste trabalho.

A Todos os outros **Professores membros do curso de Pós Graduação da Universidade Federal de Pernambuco(UFPE)** que contribuíram sobremaneira na elaboração deste trabalho, através dos conhecimentos e experiências compartilhadas

A todos os colegas de Turma que me acompanharam e compartilharam bons momentos em prol da ciência: **Angeline, Bruno, Deborah, Iracema, Isabela, Jose Anderson, Ludmila, Keyla, Roberta , Raphaela e Rodrigo**

A minha colega e amiga **Talita Tenório Ribeiro de França**, pela presteza com que se propôs a colaborar nesta pesquisa, meus sinceros agradecimentos e Sucesso pra você!

À secretária **Oziclere** pelo sua maneira de ser e dedicação ao trabalho, driblando as broncas e buscando melhores soluções para a eficiência na secretaria da Pós graduação, sei que não é fácil!, Ozi, muito Obrigada! Agradeço também a presteza e ajuda da funcionária **Tânia!**

Aos demais **funcionários da UFPE**, em especial ao **técnico** de laboratório **Rogério Clericuzi** pela grande colaboração e ajuda no processamento das Lâminas durante a pesquisa do doutorado.

Aos **animais**, que inocentemente forneceram e continuam fornecendo sua vida em prol da ciência, meu respeito e agradecimento

E a **todos** aqueles que, de uma maneira direta ou indireta, colaboraram e me apoiaram no decorrer da conclusão deste doutorado

*"A persistência é o caminho do
êxito"*

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do metotrexato em altas doses na evolução de lesões periapicais induzidas em molares de ratos e na região do periápice. **Métodos:** 35 ratos Wistar machos foram utilizados. As polpas dos primeiros molares inferiores foram expostas utilizando broca esférica ½ acoplada a motor de alta rotação. Após 30 dias, 7 grupos foram formados contendo 5 animais em cada um: G1- sem indução de lesão periapical e com administração intraperitoneal semanal (AIS) de solução salina (NaCl 0,9%) durante 2 semanas e sacrifício 2 dias após última AIS; os grupos G2, G3 e G4 sofreram indução de LP e AIS de solução salina por 2 semanas sendo sacrificados após 2, 4 e 7 dias, respectivamente. Os grupos G5, G6 e G7 sofreram indução de lesão periapical e AIS de MTX (12mg/kg/sem) por 2 semanas, sendo sacrificados após 2, 4 e 7 dias respectivamente. Para mensurar o tamanho das LP, foram realizadas tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC). Também foi realizada análise histológica para verificar intensidade do infiltrado inflamatório e presença de reabsorção óssea. As análises estatísticas utilizadas foram o teste ANOVA e o Kruskal-Wallis. **Resultados:** O tamanho das lesões periapicais nos grupos controle e do metotrexato não mostrou diferença estatisticamente significativa. As lesões periapicais apresentaram reação inflamatória crônica variando de leve a moderada, sem diferença significativa entre os grupos ($p=0,2$). **Conclusão:** Na presença das LP persistentes associadas ao canal radicular, o tratamento com MTX em altas doses não influenciou na progressão das lesões periapicais crônicas.

Palavras-chave: Inflamação endodôntica . Lesões periapicais. Metotrexato. Ratos.

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to determine the effect of high dose methotrexate in PL induced in rat molars and periapical region. **Methods:** It was used 35 male Wistar rats. To induce periapical lesions, the pulps of first mandibular molars were exposed using a ½ round bur on a high-speed handpiece. After 30 days, 7 groups were formed with 5 animals in each one. G1: no induction of periapical lesions and with weekly intraperitoneal administration (WIPA) of saline solution (NaCl 0,9%) and sacrifice after 2 days. The groups G2, G3 e G4 suffered periapical induction and WIPA of saline solution for 2 weeks being sacrificed 2, 4 and 7 days respectively. The groups G5, G6 e G7 suffered periapical induction and WIPA of MTX (12mg/kg/week) for 2 weeks, being sacrificed 2, 4 and 7 days respectively. For measure the size of the PL, CBCT were performed. A histomorphological analysis was also performed to determine the intensity of the inflammatory infiltrate and the presence of bone resorption. Statistical analyzes used were ANOVA and Kruskal-Wallis test. **Results:** The size of periapical lesions in control and methotrexate groups showed no statistically significant difference($p=0,2$). PL were composed by chronic inflammatory reaction ranging from mild to moderate. **Conclusions:** According to the data obtained, in the presence of persistent PL associated with the root canal, treatment with high doses of MTX did not influence the progression of these lesions.

Key words: Endodontic Inflammation. Periapical lesions. Methotrexate. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmulas estruturais do ácido fólico e metotrexato.....17

(fonte: <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9metotrexato/semelhanças.html>)

Figure 1: sagital views of mandibular first rat molars **A)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G2**(1,7mm) **B)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G3**(1,5mm); **C)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G4**(1,65mm).....47

Figure 2: sagital views of mandibular first rat molars **D)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G5**(1,5mm) **E)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G6**(1,6mm); **F)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G7**(1,46mm).....48

Figure 3: Histological findings in periapical regions. Groups: **G1** showed no inflammatory infiltration(HE , original magnification x500µm); **G2** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x200µm); **G3** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x200µm); **G4** showed moderate inflammatory infiltration).....48

Figure 4: Histological findings in periapical regions. Groups: **G5** showed mild inflammatory infiltration(HE , original magnification x200µm); **G6** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x200µm); **G7** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x100µm).....49

LISTA DE TABELAS

Table 1: Control and experimental groups used in the study.....	35
Table 2 : Mean size of the periapical lesions and analysis of matching control and experimental groups.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

PGE ₂	Prostaglandina
RNA _m	RNA mensageiro
MTX	Metotrexato
Mg	Miligrama
Kg	Kilograma
Kv	Kilovolt
mA	miliamper
CBCT	Tomografia Computadorizada por feixe cônico
TCFC	Tomografia Computadorizada por feixe cônico
Mm	milímetro
HNO ₃	ácido nítrico
HE	Hematoxilina-eosina
µg	micrograma
PL	lesão periapical
LP	lesão periapical
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
G5	Grupo 5
G6	Grupo 6
G7	Grupo 7
DNA	ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug administration
FDA	Administração de alimentos e drogas
R1	radical
R2	radical
OH	hidroxila
H	hidrogênio

NH ₂	radical amino primário
CH ₃	radical metil
RNA	ácido ribonucleico
DHFR	enzima dihidrofolato redutase
S	síntese
A _{2A}	tipo de receptor de adenosina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
IFN γ	Interferon
IL	Interleucina
IgG	Imunoglobulina G
IgA	Imunoglobulina A
Cy	Ciclofosfamida
MIF	Fator inibitório de migração dos macrófagos
L	Litro
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa B
RANK L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa Beta
OPG	Osteoprotegerina
MCS-F	Fator de estimulação da colônia de macrófagos
AF	ácido folínico
VO	via de administração oral
IM	via de administração intramuscular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Estrutura molecular e mecanismo de ação do metotrexato	17
2.2 Indicação Terapêutica	18
2.3 Efeitos colaterais na cavidade oral	19
2.4 Imunossupressão	24
2.5 Lesões Periapicais e Metotrexato	26
3 OBJETIVO	31
3.1 Objetivos específicos	31
4 Methotrexate effects at high doses in the progression of inflammatory periapical lesions in a murine model: histological and imaginological analysis	32
4.1 INTRODUCTION	33
4.2 METHODS	33
4.3 RESULTS	37
4.4 DISCUSSION	37
4.5 CONCLUSION	41
4.6 ACKNOWLEDGMENTS	42
4.7 REFERENCES	42
4.8 TABLE	47
4.9 FIGURES	47
5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	56
Anexo A	56

1 INTRODUÇÃO

O primeiro antifólico sintetizado foi a aminopterina ou ácido 4-amino-pterilglutâmico. Esse composto apresentou alta toxicidade causando a depressão da medula óssea em ratos, conforme resultados obtidos.¹ Desde então, tem sido sintetizados vários antagonistas do ácido fólico, sendo a ametopterina ou ácido 4-amino-N¹⁰metilpteril glutâmico atualmente o mais usado. Diante da importância do folato na síntese de DNA, os antagonistas do ácido fólico foram os primeiros agentes antimetabólitos a serem utilizados no tratamento do câncer, sendo o metotrexato o primeiro fármaco utilizado em monoterapia. O Metotrexato foi aprovado pela FDA como droga oncológica em 1953. Mesmo disponível desde 1948, foi introduzido como agente antipsoríase em 1958, e aprovado pela FDA para essa indicação desde 1971.²

Modelos de animais têm sido utilizados com o objetivo de avaliar o efeito das dosagens do metotrexato na progressão de lesões periapicais inflamatórias, por meio de análises histológica, imunohistoquímica e imaginológica, bem como por análise bacteriológica no sangue periférico dos animais.^{3,4,5,6,7,8} Yamasaki et al¹² analisaram o efeito da neutropenia induzida pelo metotrexato no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos que tiveram suas polpas expostas ao meio oral. Eles observaram que houve inibição da infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, no desenvolvimento da lesão periapical em ratos que receberam o metotrexato antes da exposição pulpar. Por outro lado, a neutropenia apresentada após a exposição pulpar, não produziu nenhum efeito no desenvolvimento da lesão.

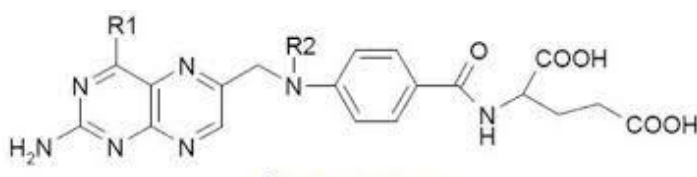
Embora a utilização do metotrexato não seja recente em alterações clínicas sistêmicas, poucos estudos mostram o efeito deste medicamento no desenvolvimento de lesões periapicais inflamatórias.

Sendo assim, este presente trabalho ora proposto, foi desenvolvido para analisar o efeito do metotrexato na progressão de lesões periapicais nos elementos de sustentação do dente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrutura molecular e mecanismo de ação do Metotrexato

O ácido fólico e o metotrexato são compostos estruturalmente semelhantes, diferindo apenas na substituição de um grupo amino por um grupo hidroxila e na adição de um grupo metila entre os grupos pteroil e benzoila.



R1 = OH, **R2** = H Ácido Fólico

R1 = NH₂, **R2** = CH₃ Metotrexato

Fig1: Fórmulas estruturais do ácido fólico e do metotrexato

Fonte: http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9_metotrexato/sem_elhancas.html

O principal alvo do metotrexato é a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), responsável pela redução do folato à tetraidrofolato. Por apresentar maior afinidade pela enzima que os folatos naturais, é capaz de inibir competitivamente, resultando em depleção dos co-fatores de tetraidrofolato¹⁰. O esgotamento dos folatos reduzidos (tetraidrofolatos) interfere nos mecanismos de síntese e reparo do DNA e replicação celular. O efeito imediato é uma interrupção abrupta na síntese de DNA, com conseqüente morte celular^{2,11}. Com a inibição da enzima dihidrofolato redutase, não ocorre a conversão do dihidrofolato para tetraidrofolato, cofator necessário à transferência de átomos de carbono, essenciais para síntese do DNA e do RNA. Também age inibindo, de forma parcialmente reversível, a enzima timidilato

sintetase, envolvida na proliferação celular¹⁶. É um agente específico da fase S do ciclo celular, atuando sobre células que se encontram em crescimento exponencial.^{13,14}

Quando o metotrexato age sobre o metabolismo da adenosina, gera seu acúmulo. Por sua vez, a adenosina em excesso vai se ligar ao receptor A_{2A} nas células endoteliais, inibindo a apoptose, quimiotaxia de neutrófilos e liberação de TNF α , IFN γ , IL-12, IL-6, demonstrando sua propriedade anti-inflamatória.¹²

2.2 Indicação terapêutica

O metotrexato é um antagonista do folato, inicialmente desenvolvido para o tratamento de câncer e posteriormente utilizado no tratamento de patologias não neoplásicas, como uma droga anti-inflamatória e imunossupressora¹⁵. Além de sua atividade antineoplásica, o metotrexato também tem sido utilizado com resultados benéficos na terapia da psoríase, uma doença cutânea comum¹⁶. Age sobre a proliferação dos queratinócitos (propriedade antiproliferativa), atua sobre os linfócitos e apresenta efeito sobre a adenosina, potente mediador anti-inflamatório.¹²

O metotrexato como droga imunossupressora, inibe as reações imunocelulares, sendo empregado, por exemplo, no transplante de órgãos e de medula óssea alogênica, bem como no tratamento da dermatomiosite, artrite reumatoide, granulomatose de Wegener e da doença de Crohn¹⁷. Quando usado em altas doses (maiores que 50mg/semana) o metotrexato apresenta atividade predominantemente antineoplásica e, a exemplo da maioria dos antimetabólitos, o metotrexato é apenas parcialmente seletivo para células tumorais e tóxico para

todas as células normais em rápida divisão, como as do epitélio intestinal e da medula óssea.^{13,18}

Quando administrado em doses baixas (de 5 a 25 mg /semana) o metotrexato apresenta ação antiinflamatória, o que pode explicar o seu efeito no tratamento da artrite reumatoide, psoríase e asma¹⁹. O mecanismo de ação anti-inflamatório do metotrexato ainda não é bem compreendido. Na asma, seu efeito pode estar relacionado à sua ação inibitória na infiltração de linfócitos e eosinófilos nas vias aéreas. Acredita-se que o metotrexato atue como antiinflamatório por mecanismos relacionados à liberação de adenosina e a efeitos diretos sobre a proliferação de células T.²⁰

O envolvimento dos ossos maxilares em lesões primárias e sítios metastáticos de tumores sólidos em pacientes com câncer é um grande problema para oncologistas, radioterapeutas, cirurgiões ortopédicos e cirurgiões buco maxilo facial. As metástases ósseas são essencialmente osteolíticas, aumentando a reabsorção óssea e a incidência patológica de fraturas.²¹

Na Odontologia, existem muitos trabalhos mostrando que o uso sistêmico de algumas drogas imunomoduladoras, dentre as quais, o metotrexato, podem provocar efeitos adversos na cavidade oral.^{22,23,24,25}

2.3 Efeitos colaterais na cavidade oral

Medicamentos quimioterápicos atuais disponíveis no mercado provocam muitos efeitos colaterais, podendo estar relacionados com complicações orais e produzir estomatotoxicidade direta ou indiretamente.²⁶

Epstein e Chow²⁴ em seus estudos, observaram que o rompimento da mucosa oral em pacientes com câncer, provavelmente ocorra devido ao agente infeccioso subjacente a doença sistêmica, ou aos efeitos tóxicos e imunossupressivos da terapia.

Em pacientes tratados com metotrexato, a redução dos níveis de Imunoglobulina A (IgA) na saliva, tem sido correlacionada com o desenvolvimento da mucosite. Uma diminuição na produção de imunoglobulinas IgG e IgA pode explicar algumas das complicações orais da quimioterapia. Neste sentido, a diminuição na IgA tem sido associada ao aparecimento da mucosite em pacientes que recebem quimioterapia.^{29,33}

Ao observar pacientes com câncer, Wong²⁸ em seu estudo verificou que mesmo os agentes quimioterápicos embora atuem com o objetivo de destruir as células tumorais, não são tão específicos e atingem células normais que apresentam altas taxas de “turnover” como as células da medula óssea, células do folículo capilar e células epiteliais do trato gastrintestinal. Algumas drogas comuns usadas na quimioterapia do câncer oral incluem o fluoracil 5, bleomicina, cisplatina, ciclofosfamida, metotrexato e vinblastina.

Complicações orais associadas com a terapia do câncer incluem doenças como estomatite, infecção, sangramento, mucosite, dor, disgeusia e xerostomia.^{28,29,30}

As complicações orais da quimioterapia são devido ao resultado da ação direta da droga sobre a mucosa oral, ou consequência indireta da supressão da medula óssea induzida pelo quimioterápico. As células da cavidade oral apresentam

alta taxa de renovação celular com ciclo de 7 a 14 dias. Para Lopez et al³¹, isto explica a especial susceptibilidade da mucosa oral aos efeitos tóxicos das drogas citostáticas.

Autores como Lopez et al³¹ e Chan et al³², que estudaram a quimioterapia e seus efeitos colaterais produzidos, descreveram um número de fatores de risco envolvidos no aparecimento da mucosite. Destes fatores, alguns são inerentes ao paciente, outros ao tipo de tumor, aos cuidados com a saúde oral e dental, a condição nutricional do paciente e manutenção dos rins e fígado. Há de se considerar, ainda, outros fatores de risco relacionados com a administração da droga como o agente citostático utilizado, a frequência da sua administração quer seja repetitiva ou prolongada e o tratamento concomitante na forma de radioterapia ou transplante de medula óssea.

Mattson et al²⁹ estudando pacientes submetidos a transplante de medula óssea e suas complicações nutricionais e orais durante período da neutropenia, observaram na metodologia empregada 48 pacientes cuja média da faixa etária correspondia a 35 anos. Estes foram divididos em dois grupos onde o primeiro foi submetido a profilaxia com depleção de células T e o segundo, a profilaxia utilizando a combinação ciclosporine e metotrexato. Os resultados deste estudo mostraram que a profilaxia com depleção de células T comparada com a profilaxia utilizando associação ciclosporine e metotrexato apresentou menor severidade em lesões da mucosa oral, menor desconforto oral e redução do número de pacientes com problemas nutricionais e necessidade de nutrição parenteral.

Kalantzis et al³³, estudaram através de relatos de casos clínicos, efeitos do metotrexato em baixas doses aplicadas a pacientes portadores de artrite

reumatoide. Destaca-se a artrite reumatóide como uma doença autoimune caracterizada pela inflamação e perda óssea, distúrbio na homeostase óssea que pode levar a destruição e deformidade das articulações. Os estudos mostraram claramente que a ulceração da mucosa é um fator comumente encontrado e ocasionalmente problemático. Devido ao aumento da utilização do metotrexato em doenças como a artrite reumatoide, os cirurgiões dentistas devem estar atentos aos efeitos das dosagens aplicadas deste medicamento principalmente na cavidade oral.^{33,34}

Puricelli et al³⁰ em seu estudo em camundongos, realizou a análise histológica e histomorfométrica da mucosite oral induzida por metotrexato. Para tal verificação, foram utilizados dois grupos, experimental e o controle, onde respectivamente foram aplicados por via subcutânea 2,5 mg/kg de metotrexato por três dias consecutivos e nada foi aplicado ao controle. Os resultados mostraram que não houve manifestações clínicas da mucosite na região ventral da língua no grupo experimental, e não houve diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos. Entretanto, a espessura epitelial do grupo experimental mostrou resultados significativamente menores em comparação ao grupo controle, levando aos autores a concluir que o metotrexato induziu resultado histológico de mucosite na superfície ventral da língua dos camundongos.

2.4 Imunossupressão

A diminuição do número de leucócitos para níveis inferiores a $4,3 \times 10^9/L$ designa-se por leucopenia e resulta geralmente de uma diminuição do número de

neutrófilos (neutropenia). As principais causas de leucopenia são o uso de fármacos que afetam a produção de leucócitos, as terapêuticas imunossupressoras e as síndromes de imunodeficiência. Sobretudo em neoplasias (linfomas e leucemias), além da contagem dos leucócitos, é fundamental o estudo morfológico e imunológico das células.^{35,36} Os neutrófilos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra invasão bacteriana extracelular. A importância destas células em combater a doença infecciosa é demonstrada através do aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas recorrentes, observada em pacientes com deficiência na produção ou função do neutrófilo.

Nikoskelain³⁷ observou que pacientes que apresentam neutrófilo com defeito quer seja quantitativo (neutropenia), quer seja qualitativo (aderência, quimiotaxia, atividade bactericida), frequentemente é acometido por ulcerações da mucosa oral, gengivites e periodontites.

O metotrexato pode ser usado para tratamento de uma variedade de distúrbios neoplásicos como sarcoma, coriocarcinoma e tumor de mamas. São frequentemente utilizados na quimioterapia em altas doses (entre 20-500mg/Kg), que acabam por produzir alterações nas células de defesa do hospedeiro. Zeller et al⁴⁰, estudando os efeitos deste medicamento, observaram também que o metotrexato produz granulocitopenia profunda, diminuição da migração do leucócito e alterações na cinética das células originárias dos granulócitos. Para isso, os autores examinaram no trato respiratório inferior de pacientes, o exsudato celular peritoneal em resposta ao estímulo inflamatório. Foi feito o acesso “in vitro” da atividade fagocitária da inflamação e dos macrófagos pulmonares com o objetivo de determinar se a administração do metotrexato prejudicou a atividade funcional do

macrófago. Os dados do estudo permitiram observar que uma simples injeção clinicamente relevante do metotrexato pode reduzir significativamente o número dos fagócitos mononucleares presentes no exsudato inflamatório e trato respiratório inferior. Embora, a atividade fagocitária não tenha sido alterada na inflamação peritoneal ou alveolar.

Glickman e Shklar⁴² estudaram uma variedade de distúrbios sistêmicos e seus efeitos na polpa de animais. Dentre os efeitos observaram a inanção (ausência de qualquer alimento), privação de proteínas (dieta com redução de 2% de proteína –período de 4 a 9 semanas), diabetes, injeção de cortisona e de formol (4% por via subcutânea por 48h). No geral, pode ser observado que houve mudanças pulpares mais severas em distúrbios sistêmicos agudos (inanção e injeção com cortisona) do que em condições sistêmicas crônicas (diabetes). Observou-se que mudanças na polpa aparentemente não específicas estavam associadas a distúrbios sistêmicos. Havia degeneração dos odontoblastos, redução do número de células da polpa e mudanças degenerativas provavelmente menos severas do que aquelas encontradas nos odontoblastos.

Nos estudos feitos em animais, Kolzet et al⁴³ analisaram a aplicação sistêmica do metotrexato e a resposta pulpar em ratos que tiveram suas cavidades dentais previamente preparadas. Foram feitos preparos cavitários nos primeiros molares inferiores com profundidade aproximada de 1mm, provocando na maioria dos casos exposição pulpar superficial com o objetivo de maximizar a resposta. Em seguida foram restauradas com amálgama. Os animais foram divididos em três grupos de 12 animais cada. Grupo 1- Metotrexato (0,25mg/Kg) três vezes por semana por via intraperitoneal; Grupo 2- solução salina (0,85mg/kg) três vezes por

semana; Grupo 3- nenhum medicamento. Dois animais de cada grupo foram sacrificados 9 horas, 3, 5, 7, 21, e 28 dias após procedimentos operatórios e uso do medicamento. Os autores verificaram que aparentemente o metotrexato inibiu a capacidade dos animais em localizar o processo inflamatório inicial efetivamente. Sendo assim, a administração sistêmica do medicamento em doses não letais comprometeu a resposta à cicatrização pulpar. Os autores sugerem a importância da observação em humanos na administração sistêmica do metotrexato e a resposta pulpar inflamatória devido a presença de caries ou procedimentos operatórios.

Os estudos de Nakamura et al⁴⁴ verificaram o efeito da neutropenia induzida pelo metotrexato na evolução de lesão periapical em ratos. Para isto, utilizaram na sua metodologia 36 ratos divididos igualmente em dois grupos: controle e experimental. Os do grupo controle não receberam nenhuma injeção, ao passo que o experimental recebeu uma injeção intraperitoneal de 7,5mg/Kg de metotrexato uma vez ao dia durante três dias antes da exposição pulpar. Esta área ficou exposta ao meio ambiente oral e então, seis animais de cada grupo foram sacrificados após 2, 4 e 7 dias. Antes do sacrifício, também foram coletados o sangue periférico para contagem do número total de leucócitos, neutrófilos e linfócitos. A média dos valores foi calculada para cada grupo em cada período. No grupo controle, o número total de leucócitos, neutrófilos e linfócitos não mostrou nenhuma mudança durante todo período experimental. Já no grupo que recebeu o metotrexato, esses números diminuíram e foram significativamente menores que o grupo controle, especialmente os neutrófilos.

Alguns autores também pesquisaram em ratos o efeito inibidor do metotrexato nos leucócitos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos produzidos na

medula óssea. É o caso de Willoughby e Giroud ⁴⁵, os quais mostraram em ratos que o número total de leucócitos, linfócitos e especialmente, neutrófilos diminuíram 7, 8 e 9 dias após a injeção de 2,5mg/Kg de metotrexato por 3 dias consecutivos. Seguindo a mesma dosagem e sequência do uso do metotrexato, Rylander ⁴⁶ também observou em seu estudo que esse tratamento resultou num aumento inicial no número de neutrófilos seguido por um decréscimo gradual. Salientando-se que a injeção do metotrexato induziu decréscimo de eritrócitos, bem como o escore do exsudato e contagem dos leucócitos. Esse autor mostrou que a resposta inflamatória aguda à irritação mecânica e química é marcadamente reduzida em ratos com neutropenia.

Yamasaki et al¹² que também verificaram em ratos o efeito da neutropenia induzida pelo metotrexato a longo prazo, observaram que a contagem dos neutrófilos diminuiu após duas semanas. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o neutrófilo representa um papel importante na defesa contra invasão bacteriana no tecido pulpar.

2.5 Lesões Periapicais e metotrexato

A inflamação periapical ocorre como consequência de vários danos a polpa dental, incluindo infecção, traumas físicos e iatrogênicos, e consequências danosas da terapia endodôntica^{38,39,47}. A relação entre a inflamação periapical e infecção bacteriana está bem estabelecida. No clássico estudo de Kakehashi et al³, ratos sujeitos a exposição pulpar mecânica e mantidos no meio microbiano convencional desenvolveram necrose pulpar e lesão periapical de maneira uniforme.^{4,38,41,47,48,49}

As lesões dentais periapicais ocorrem como uma reação do tecido periapical a infecção bacteriana e consiste da inflamação periapical, destruição alveolar óssea e reabsorção da raiz.^{44,48,50,51}

Estudos que induziram lesões periapicais em modelos de ratos, verificaram mediadores da atividade de reabsorção óssea em extratos obtidos das lesões periapicais. Seus tecidos apresentaram entre os dias 10º e 15º alto nível de reabsorção óssea, declinando a partir do 20º dia e chegando a um nível estável no 30º dia.^{48,56,59} Os resultados dos testes de imunoensaio indicaram que a Interleucina IL-1 α é o mediador de reabsorção predominantemente presente em ambas fases aguda e crônica no desenvolvimento da lesão periapical. Entre os dias 10º e 15º, além da IL-1 α , também foi detectada a presença da IL-1 β e a presença da PGE₂ devido ao efeito indireto e sinérgico com a IL-1 α .^{39,41,47,54}

A lesão periapical que representa uma reação inflamatória e imunológica, também resulta na reabsorção óssea em torno do ápice radicular. Muitos autores acreditam que a habilidade dos linfócitos T ativados para dar suporte a osteoclastogenese é provocada pela expressão osteoclastogenica da citocina RANKL^{56,57}. Tem sido demonstrado que muitos fatores são responsáveis pela estimulação da reabsorção óssea como as precoces citocinas proinflamatórias IL-1, TNF α , IL-6 e IL-11. Estudos prévios têm demonstrado que o MIF induz a expressão do TNF- α , IL-1, IL-6 e a prostaglandina PGE₂ que promove a expressão do RANKL.^{52,53,56}

Nos estudos de Kawashima e Stashenko⁵² feitos em extratos de lesões periapicais removidos de ápices radiculares de molares ratos, não foram observados

a presença de IL-1 α em grupos de animais em tecidos periapicais normais, que não sofreram exposição pulpar, apesar da presença do RNAm. Entretanto, em tecidos periapicais examinados no 7º e 14º dias após exposição pulpar, houve aumento estatisticamente significativo da presença da IL-1 α que atingiu o maior pico no 28º dia.⁵⁴ A presença do TNF α foi maior nos 7º e 28º dias em comparação com as amostras de tecidos normais. A presença do TNF α e IL-6 também foi detectada em ambos tecidos, sendo que o TNF α mostrou-se significativamente maior no 7º dia e 28º dia após exposição. Os autores verificaram que a IL-1 apresenta um papel principal não só na patogênese da lesão periapical, como também na periodontite, artrite reumatoide e osteoporose, que apresentam destruição óssea.

Com o objetivo de realizar a análise histológica e histométrica na região pulpar e periapical em polpa de ratos, Yamasaki et al ⁴⁸ utilizou 40 ratos que tiveram suas polpas expostas mecanicamente ao meio oral. Após 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, e 56 dias foram sacrificados os animais. Os achados histológicos e histométricos mostraram que em 14 dias, o tecido pulpar se apresentou quase todo necrosado, completando-se por volta de 28 dias. Na análise histométrica, observou-se que primeiramente a lesão periapical se estende no sentido méso distal com a reabsorção do osso esponjoso e verticalmente com a reabsorção do osso cortical e cemento. Os resultados histométricos sugerem que a inflamação periapical tem início antes da necrose pulpar.^{4,48} Os dados deste estudo sugerem que a invasão da bactéria anaeróbica, necrose pulpar e formação de lesão periapical ocorreram entre 7 e 14 dias após a exposição pulpar.^{4,48,50}

Tagger e Massler⁴, trabalhando com ratos, relataram que tão logo haja exposição pulpar, a região periapical apresenta áreas de reabsorção.

Conduziram um estudo no qual induziram lesão periapical em molares de ratos, observando as reações dos tecidos periapicais em intervalos variando de 2 dias a um ano após exposição pulpar. Verificaram que a severidade da lesão, relacionava-se com a quantidade de polpa vital ainda presente no dente, ao invés do lapso do tempo após a exposição. Um mês após exposição pulpar, a maior parte das polpas tinha sofrido necrose e as lesões em torno do ápice apresentaram dois tipos de reação: supurativa ou reparativa.

Yu e Stashenko³⁸ em seus trabalhos, utilizaram 40 ratos que sofreram indução de lesões periapicais por meio de exposição pulpar experimental. Em 15, 20, 30, e 90 dias após a indução, as células inflamatórias foram isoladas e contadas através de critérios morfológicos e fenotípicos. Os linfócitos foram as células predominantes com aproximadamente 50 a 60% do infiltrado celular. Os neutrófilos polimorfonucleares também estavam presentes (25 a 40%). A minoria foi composta por macrófagos/monócitos, eosinófilos e plasmócitos (10 a 15%). Os linfócitos T foram continuamente mais numerosos indicando que lesões periapicais são dominadas por Linfócitos T tanto na fase inicial quanto na fase crônica da lesão.

Yamasaki et al¹² analisaram em seu estudo o efeito do metotrexato em ratos, induzindo exposição pulpar e lesão periapical nos molares. Foi realizada análise histológica e histomorfométrica das raízes mesiais. 45 ratos foram divididos em três grupos: Grupo A - não recebeu injeção. Grupo B - injeção intraperitoneal 1,0mg/kg de MTX por três semanas após exposição pulpar; Grupo C - injeção de MTX quatro semanas antes da exposição pulpar. Após 2, 4 e 6 semanas os animais foram sacrificados. Esse estudo observou que se a neutropenia iniciava antes da

exposição pulpar, havia inibição no desenvolvimento da lesão, mas se iniciava ao mesmo tempo da exposição pulpar, não havia efeito no desenvolvimento da lesão.

Nakamura et al⁴⁴ observaram os efeitos do metotrexato na evolução da lesão periapical. Trinta e seis ratos tiveram seus molares expostos e foram divididos igualmente em grupo controle e grupo experimental, onde nenhuma solução foi aplicada no controle, e no experimental foi aplicado 7,5 mg/kg de metotrexato por três dias consecutivos antes da exposição pulpar. Seis animais de cada grupo foram sacrificados 2, 4 e 7 dias após a exposição. Os autores observaram que após 7 dias o grupo controle apresentou abscesso, moderada infiltração de neutrófilos no tecido pulpar residual e pequena infiltração de neutrófilos no tecido periapical. No grupo experimental, a neutropenia resultou na inibição da formação de abscesso após exposição pulpar. Neste grupo, os resultados estatísticos histométricos mostraram a área da necrose pulpar mais larga que o grupo controle, contudo, não houve diferença entre os grupos em relação a área do ligamento periodontal apical.

Convém destacar que o periodonto de sustentação, no qual o osso alveolar faz parte, além do cimento e ligamento periodontal, é um elemento que sofre alterações contínuas representadas por aposição e reabsorção ósseas. Logo, o uso do metotrexato deve atuar nesse mecanismo ativo.^{11,58}

3 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar por meio da análise histológica e imaginológica o efeito do metotrexato em altas doses na progressão de lesões periapicais induzidas em tecido pulpar de ratos.

3.1 Objetivos específicos

- . Avaliar através da tomografia computadorizada de feixe cônico e análise histológica, lesões periapicais crônicas e osso alveolar adjacente em ratos tratados com metotrexato;
- . Determinar o maior diâmetro das lesões periapicais e intensidade da reação inflamatória.

4 Methotrexate effects at high doses in the progression of inflammatory periapical lesions in a murine model: histological and imaginological analysis

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to determine the effects of high dose methotrexate in PL induced in rats molars and periapical region. **Methods:** It was used 35 male Wistar rats. To induce PL, the pulps of first mandibular molars were exposed using a ½ round bur on a high-speed handpiece. It was expected 30 days. Then, 7 groups were formed with 5 animals in each one. G1: no induction of periapical lesions but with weekly intraperitoneal administration (WIPA) of saline solution (NaCl 0,9%) for 2 weeks and sacrifice after 2 days of last WIPA. The groups G2, G3 and G4 suffered periapical induction and WIPA of saline solution for 2 weeks being sacrificed 2,4 and 7 days respectively. The groups G5, G6 and G7 suffered periapical induction and WIPA of methotrexate (12mg/kg/week) for 2 weeks, being sacrificed 2, 4 and 7 days respectively. CBCT was performed to measure the size of PL. A histomorphological analysis was also performed to determine the intensity of the inflammatory infiltrate and the presence of periapical bone resorption. Statistical analyzes used were ANOVA and Kruskal-Wallis test. **Results:** The size of periapical lesions in control and methotrexate groups showed no statistically significant difference ($p=0,2$). PL were composed by chronic inflammatory reaction ranging from mild to moderate, predominantly of lymphocytes. **Conclusion:** According to the data obtained, in the presence of persistent PL associated with the root canal, treatment with high doses of MTX did not influence the progression of these lesions.

Keywords: Periapical lesions; Methotrexate; Rats

4.1 INTRODUCTION

Treatment for cancer patients can cause significant side effects in the maxillofacial region. The type and intensity of side effects will depend on the mechanism of action of the drugs used. Among these drugs, there are those that cause predominantly cytotoxic acute effects, such as methotrexate.

Methotrexate (MTX), 4-amino-N¹⁰-methyl pteroylglutamic acid, a synthetic drug also known as amethopterin, is an antimetabolite that is structurally similar to folic acid. MTX interferes with the synthesis and repair of DNA during cell replication and has anti-inflammatory and antineoplastic properties(27,39-40). This potent anti-neoplastic agent used to treat leukemia, osteosarcoma and some types of carcinoma, causes a significant side effects, such as leukopenia (9,41).

Systemic conditions may admittedly influence the development of odontogenic inflammatory lesions, including chronic periapical lesions that are of endodontic origin. Similarly, these odontogenic inflammatory lesions may also influence systemic diseases, sometimes constituting risk factors for systemic complications (1-5). Although chemotherapy offers benefits, it may arises direct damages and indirect due to immunosuppression induced by therapy (6,7). Chemotherapy may cause serious side effects, from oral mucositis caused by the direct action of the drug in the epithelial cells of the mucous lining up to septicemia due to significant drug-induced leukopenia.(8)

In recent years, various studies have shown that localized inflammation in the oral cavity is associated with increased levels of systemic disease markers (1, 2,35). Some previous investigations have shown the impact of diabetes and cardiovascular diseases on periapical healing, probably due triglyceride levels and free radical production,

respectively (1-3). Some studies that used immunosuppressive drugs had an inhibitory effect on the development of the periapical lesions (24,28,34-36). More recently, it was demonstrated that *epigallocatechin gallate*, an active ingredient contained in green tea, displayed protective effects in a rat model of apical periodontitis *in vivo* (37).

There are few studies evaluating patients with chronic periapical lesions that will undergo chemotherapy for malignancy (10,15-18). Thus, the objective of this study was to evaluate *in vivo* the effects of methotrexate in the onset and progression of chronic periapical lesions induced in the lower first molars of rats.

4.2 METHODS

The Local Ethics Committee on Animal Use (protocol # 23076.042032/2011-46) approved this study. Thirty-five male rats (*Rattus norvegicus*, *albinus* Wistar) were used, which weighted between 220 and 250 grams. The animals were housed in a vivarium where they received a standard rat diet (Presença Ratos e Camundongos, Presença, Paulínea, SP, Brazil) and water *ad libitum*. They were kept in a room with a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and light/dark cycle of 12:12 hours.

Previously to experimental procedures, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride 1 mL / kg (SESP, Vetbrands Animal Health Division, Jacareí, São Paulo, Brazil) associated with xylazine 0.5 mL / kg (Bayer Brazil, Belford Roxo, Rio de Janeiro, Brazil) intramuscularly. In order to induce periapical lesions in animals, the pulps of the first bilateral molars were exposed on the occlusal surface using carbide bur $\frac{1}{2}$ coupled to high speed hand piece. The dental pulps remained exposed for 30 days in the oral cavity, according to the author's methodology. After induction of periapical lesions, the animals were randomly distributed into 7 groups according to drug administration and analysis time. The sequence description are summarized in Table 1.

The animals of experimental group were treated with methotrexate (Lexato, Laboratories Pierre Fabre do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, Brazil) using a dosage of 12mg/Kg/week, for 2 weeks, administered intraperitoneally, while control groups were treated with saline solution (NaCl 0,9%) also administered intraperitoneally.

Table 1 – Control and experimental groups used in the study

Groups	N	Experimental procedures
G1 (control)	5	Negative control – without periapical lesion. Saline solution administered intraperitoneally (IP) one time a week for 2 weeks. Analysis after the last dose.
G2 (PL2)	5	Positive control – periapical lesion induction, Saline solution administered IP one time a week for 2 weeks and analysis after 2 days after last dose.
G3 (PL4)	5	Positive control – periapical lesion induction, Saline solution administered IP one time a week for 2 weeks and analysis after 4 days after last dose.
G4 (PL7)	5	Positive control – periapical lesion induction, Saline solution administered IP one time a week for 2 weeks and analysis after 7 days after last dose.
G5 PL-MTX- 2	5	Periapical lesion induction, 12 mg/Kg of methotrexate administered one time a week for 2 weeks and analysis after 2 days after last dose.
G6 PL-MTX- 4	5	Periapical lesion induction, 12 mg/Kg of methotrexate administered one time a week for 2 weeks and analysis after 4 days after last dose.
G7 PL-MTX- 7	5	Periapical lesion induction, 12 mg/Kg of methotrexate administered one time a week for 2 weeks and analysis after 7 days after last dose.

After the period of analysis established, the animals were euthanized by anesthetic overdose with ketamine hydrochloride and xylazine. The mandibles were dissected and placed into plastic recipient containing 10% formaldehyde solution. In these recipients, the specimens were submitted to cone-beam computed tomography

(CBCT) (i-CAT Next Generation, Imaging Sciences International, Hatfield, PA, USA), operating at 120 kV and 3.8 mA, using a protocol with voxel size of 0.2 mm and an exposure time of 26 seconds. Then, images were reconstructed and evaluated using the XORAN software (Xoran CAT version 2.0.21, Xoran Technologies, Ann Arbor Mich, USA). A specialist in Oral Radiology with experience in the method used analyzed the images in multiplanar reconstructions (axial, sagittal and coronal). The measurement was taking in the larger diameter of the lesions associated with the mesial root of the mandibular first molar in each specimen analyzed, using sagittal views with 0.25 mm of thickness. A single analysis was performed and the evaluator was blinded with respect to groups analyzed. It was used a 22"flat screen monitor (Dell Precision 390™, Dell Inc., Round Rock, Texas, USA). Images density and contrast were accordingly adjusted to help the observer.

After the image analysis, the jaws were decalcified in 5.0% aqueous nitric acid (HNO₃) for 48 hours. Then, a histological conventional procedure was performed. Histological sections of 5µm were obtained from paraffin blocks and stained with hematoxylin-eosin (HE). In order to determine the intensity of the inflammatory infiltrates (acute or chronic type), a histological analysis was carried out. The inflammatory reaction in the periapical lesions was classified as slight (scarce or focal inflammatory reaction), moderate (moderate amount of inflammatory cells) or severe (diffuse inflammatory reaction). During analysis, the evaluator was also blinded with respect to group studied.

The histological and imaginological data were analyzed by descriptive statistic. The imaginological data that showed uniform distribution were analyzed by ANOVA and for those that showed non-homogeneous distribution, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used, considering a significance of 5%. Statistical calculations were performed using SAS 9.2 software.

4.3 RESULTS

In the imaging analysis, the periapical lesions were evident in the periapical area of right mandibular first molars in all groups and were identified by CBCT(figs 1-2).

The size of periapical lesions in control and methotrexate groups were measured and showed no statistically significant difference ($p=0.2$). The measures observed in imaging analysis are shown in Table 2.

In the histological analysis, the periapical lesions in all specimens were composed of fibrous connective tissue infiltrated by chronic inflammatory reaction, formed predominantly for lymphocytes. Periapical lesions were both areas with mild chronic inflammation as areas with inflammation of moderate intensity. Specimens of Group G7 (Fig 4) had mild inflammatory reaction in all specimens, but there was no significant difference between groups ($p=0.62$), (Figs 3-4).

4.4 DISCUSSION

There are few studies that evaluate patients with chronic periapical lesions that will undergo anti neoplastic therapy. The presence of these lesions may be a risk factor for the development of acute infection during therapy. Thus, it becomes necessary to know methotrexate role in the progression of the periapical lesion. In addition, there are few studies assessing the possible effects of methotrexate in the evolution of chronic periapical pathologies in animals. (2,3,5,9,41).

In order to generate evidence for protocols in dental treatment, this study observed the behavior of periapical lesions in rats treated with methotrexate (MTX). This drug was chosen for the purpose of inhibiting the growth of lymphocytes subpopulations.

(28,41) Other immunosuppressive drugs have also been tested in animal models by many researchers, to simulate radiographic and histological features of the immune response in the development of periapical lesions.

Lopes et al (26) showed a reduction of circling lymphocytes in periapical lesions of immunosuppressed groups treated with cyclophosphamide at daily dosages of 10mg/Kg, and Watermann et al (34) also reduced periapical lesions in rats, using a weekly dosage of 50mg/Kg of cyclophosphamide. This experiment used dosages equivalent to those used in treatment of human lymphomas or leukemia. On the other hand, Metzger et al (35) tested dexamethasone with 0,5mg/Kg in periapical lesions every third day during 14 days and 21 days. This drug had an inhibitory effect on the development of the periapical lesions when compared with control groups. Moreover, Kawahara et al. (36) showed a reduction of T lymphocytes cells in groups treated with cyclosporine, at daily dosages of 5, 10 and 20mg/Kg/day for 4 weeks. In the actual conditions of this experiment studied, the methotrexate, an immunosuppressive drug, applied at dosages of 12mg/Kg once per week during 2 weeks, did not show an inhibitory effect of periapical lesions in both experimental and control groups.

Methotrexate has been administered orally or intravenously, in daily clinical treatment. In the present study, it was administered intraperitoneally, similar to other published reports (28,29,30,41). Even though that intraperitoneal administration results in a lower plasmatic concentration of the drug, this technique was chosen because it is safer and easier to apply in small animals. The dosages used in experimental studies vary widely. Willoughby and Giroud (28) and Rylander(29) administered a dose of 2,5 mg/kg. Yamasaki et al (41) used a dose of 1,0mg/Kg, whereas Nakamura et al (9) used a dose of 7,5 mg/kg of methotrexate in rats. In this study, we used the dosage of 12 mg/kg/ week per 2 weeks. Although it can be considered a high dose, its use has been

safety demonstrated in these previous studies and it was chosen to increase the probability of leukopenia in the studied animals.

In the present study, periapical lesions were induced by pulp mechanical exposure, according to protocols used in the literature (1,9,21,23,25). Studies have showed that after pulp exposure in rats, pulpal necrosis and periapical lesions extended maximally between 7 and 14 days (22). Morimoto et al (32), also observed that periapical inflammation, developed from 7 to 21 days, subsided after 28 days and subsequently decreased at 42 days. This is in agreement with the findings of a previous study that observed pulp necrosis in the experimental period of 15 and 30 days (38). Osteoclasts in periapical lesions could be found at day 2 and the peak number of these cells was reached at day 14. In these studies, it was also observed that increasing amounts of inflammatory infiltration and alveolar bone resorption occurred in the periapical region from day 7 to day 14 (42,43). Between 0 and 20 days occurred a period of lesion expansion and bone destruction (31). Based on these studies, the pulps were exposed in the oral cavity for a period of 30 days to induce periapical lesion.

According to the methodology of this study, we expected a period of 30 days, and applied the methotrexate (MTX) in a dosage of 12mg/Kg/week per 2 weeks in the intervals of the 2, 4 and the 7 days, and this drug did not promote greater inhibition in the progress of the periapical bone resorption after pulpal exposure. This is not in agreement with the studies of Yamasaki et al (41) which analyzed the progression of periapical lesions, after pulpal exposure in the intervals between 2, 4 and 6 weeks. Our study also is not in agreement with Nakamura et al(9) that observed periapical lesions after 2, 4 and 7 days after pulpal exposure. Yamasaki et al (41) showed that when the experimental group received MTX 3 times a week before pulpal exposure, methotrexate-induced neutropenia inhibited the development of periapical lesions. After 6 weeks, the

histological findings showed its periapical inflammation in experimental groups weaker than that of the control group and in the group that received MTX after pulpal exposure. The neutrophil count statistically decreased at 2 weeks after the first injection of methotrexate. Nakamura et al (9) showed that the area of pulpal necrosis in the experimental group was statistically larger than that of the control group, although, both groups showed no difference in the size of the periodontal ligament area. This is probably because the histometrical results showed that the neutropenia reduced the extent of abscess formation after pulpal exposure and increased the area of pulpal necrosis due to the poorly opposed of the pulpal tissue. Rylander (29) demonstrated that the number of leukocytes that infiltrated an implanted chamber in rats, decreased if the animals were injected with methotrexate. It is well known that the neutrophils infiltrate in an early stage of inflammation. This fact occurred with the studies of Yamasaki et al (41) and Nakamura et al (9) and probably it had occurred in the present study.

The histological analysis, in the present study, are not in consistence with these previous studies (21, 25, 41) since these authors analyzed the progression of periapical lesions between the 7th and 14th until the 28th day after pulpal exposure. Although, in this study, the pulp exposure of the experimental group G7, had been 7 days, this group showed mild inflammatory reaction in all specimens. There was no significant difference between group G7 and the groups G2, G3, G4, G5, G6 ($p=0.62$) (Table 1).

Yamasaki et al(22) corroborated with our findings because in their histological studies, in pulpal and periapical tissues in rats, it was observed that at 56 days, necrosis remained in the periapical tissue but, inflammatory cell infiltration decreased in the periapical tissue and fibrous tissue proliferation increased as well as the alveolar bone and apical root resorption was still found.

The periapical lesions size in this study were measured by micro-computed tomography scanning. Some authors have assessed the apices of the molar roots of mouse mandibles by other radiographic techniques to observe the growth of periapical lesions.(22,24,38). These authors have observed radiographically that periapical lesion extended maximally between 7 and 14 days (21,24). Teixeira et al (38) confirmed radiographically the presence and intensity of bone resorption observed by the histological study. These authors observed bone resorption at 2, 15 and 30 days, and observed in the 30 day experimental period a large area of resorption, but a smaller number of osteoclasts were present (22,24,25,33). The amount of periapical bone was minimal, and it was replaced by inflammatory tissue. In the present study, the size of periapical lesions were similar among groups (Table 2). This probably occurred because after 42 days, there were no further expansion in the periapical lesions (32). Moreover, the methotrexate did not inhibit the growth of periapical lesions as demonstrated in the experimental conditions of this study ($p=0,2$).

Depending on the dosage, frequency and intensity with which it is applied, methotrexate can provoke some degree of systemic side effects. In Dentistry, further studies are necessary for the provision of safe procedures including the endodontic treatment of patients with chronic periapical lesions and will undergo anti-neoplastic therapy.

4.5 CONCLUSION

According to the data obtained, high doses of methotrexate did not influence the population of inflammatory cells and the size of the chronic periapical lesions in rats.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the (FACEPE) SUPPORT FOUNDATION SCIENCE AND TECHNOLOGY OF PERNAMBUCO STATE for the financial support granted to this work.

4.7 REFERENCES

1. Wolle CFB, de Aguiar Zollmann L, Etges A, Vitalis GS, Leite CE, Campos MM. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy 2012; J Endod. 38:191-195, 2012.
2. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. Clin Oral Investig. 2012
3. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population 2012; J Endod. 38:297-300
4. Cotti E, Schirru E, Acquash E, Usai P. An overview on Biologic Medications and their possible role in Apical Periodontitis. J Endod 2014; 40(12):1902-09.
5. Astolphi RD, Curbete MM, Chiba FY, Cintra LTA, Ervolino E, Mota MSO et al. Periapical Lesions Decrease Insulin signaling in Rat Skeletal Muscle. JEndod 2015; 41(8): 1305-10.
6. Peterson DE. Pretreatment strategies for infection prevention in chemotherapy patients. NCI Monogr. 9: 61–71, 1990.
7. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. Crit Rev Oral Biol Med. 14: 199–212, 2003.

8. Peterson DE. Oral toxicity of chemotherapeutic agents. *Semin Oncol.* 19: 478-491, 1992.

9. Nakamura K, Yamasaki M, Nishigaki N, Iwama A, Imaizumi I, Nakamura H, Kameyama Y. Effect of methotrexate-induced neutropenia on pulpal inflammation in rats. *J Endod.* 28: 287-290, 2002.

10. Toljanic JA, Bedard JF, Larson RA, Fox JP. A prospective pilot study to evaluate a new dental assessment and treatment paradigm for patients scheduled to undergo intensive chemotherapy for cancer 1999. *Cancer* 85: 1843-1848, 1999

11. Rolston KV. The Infectious Diseases Society of America 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in patients with cancer and neutropenia: salient features and comments. 2004; *Clin Infect Dis.* 39: 44–48.

12. Lerman MA, Laudendach J, Marty FM, Baden LR, Treister NS. Management of Oral Infections in Cancer Patients. *Dent Clin N Am.* 52:129–153, 2008.

13. Donnelly JP, Muus P, Horrevorts AM et al. Failure of clindamycin to influence the course of severe oromucositis associated with streptococcal bacteremia in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Scand J Infect Dis* 1993; 5:43–50.

14. Ruescher T, Sodeifi A, Scrivani SJ, et al. The impact of mucositis on alpha haemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematological malignancies. *Cancer* 1998; 82:2275–2281.

15. Greenberg MA, Cohen SG, McKittrick JC, et al. The oral flora as a source of septicemia in patients with acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53:32–36

16. Overholser CD, Peterson DE, Williams LT, et al. Periodontal infection in patients with acute nonlymphocytic leukemia: prevalence of acute exacerbations. *Arch Intern Med.* 142: 551–554, 1982.

17. Dreizen S, McCredie KB, Bodey GP, Keating MJ. Quantitative analysis of the oral complication of antileukemia chemotherapy. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1986; 62: 650- 653.

18. Sonis ST, Woods PD, White BA. Pretreatment oral assessment. *NCI Monogr* 1990; 9: 29-32.

19. Buhroo AM, Baba AN. Adverse effects of Low dose Methotrexate in Patients with Rheumathoid Arthritis. *IJPMR*. October 2006; 17(2): 21-25

20. Yoshinari N, Kameyama Y, Ayoyama Y, Nishiyama H, Noguchi T. Effect of long term methotrexate induced neutropenia on experimental periodontal lesion in rats. *J Period Res* 1994; 29: 393-400.

21. Kakehashi S, Stanley H R, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ free and conventional laboratory rats. *O.S, O.M e O.P.* September 1965; 20 (3)

22. Yamasaki M, Kumazawa M, Koshaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and Periapical Tissue Reactions after Experimental Pulpal Exposure in Rats. January 1994; *Journal of Endodontics*. 20(1): 13-17

23. Tagger M, Massler M. Periapical tissue reactions after pulp exposure in rat molars. *Oral Surg*. February 1975; 39(2): 304-316.

24. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory Cells in Developing Rat Periapical Lesions. *Journal of Endodontics* nov 1987; 13(11): 545-40.

25. Stashenko P, Wang C, Tani-Ishi N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg* 1994; 78: 494-502

26. Lopes M A, Spolidorio L C, Line SRP, Almeida OP. Pulpal lesions in normal and cyclosporin A treated rats. *J endod* 1997; 23: 52-3.

27. Cronstein BN. Molecular therapeutics Methotrexate and its mechanism of action Arthritis Rheum. 1996;39:1951-1960
28. Willoughby DA, Giroud JP. The role of polymorphonuclear leucocytes in acute inflammation in agranulocytic rats. J Pathol 1969;(98):53-59
29. Rylander H. Acute inflammation and granulation tissue formation in neutropenic rats. Odontol Revy 1974 25: 147-56
30. Zeller JM, Cunera MB, Gudewicz PW. Effects of high dose methotrexate on rat alveolar and inflammatory macrophage populations. 1984; Inflammation 8(3)
31. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. J Endod 1992;18(9):422-6
32. Morimoto T, Yamasaki M, Nakata K, Tsuji M, Nakamura H. The expression of Macrophage and neutrophil elastases in rat periapical lesions. J Endod Sep 2008; 34(9): 1072-6
33. Tanomaru Filho M, Tanomaru JMG, Duarte MAH, Gonçalves M. Comparative Radiographic and histological analysis of periapical lesion development. Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol and Endod 2009; 107(3): 442-47.
34. Watermann Jr PA. Development of Periradicular lesions in immunosuppressed rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:720-5
35. Metzger Z, Klein H, Klein A, Tagger M. Periapical lesion Development in Rats Inhibited by Dexamethasone. J Endod 2002; 28(9): 643-45
36. Kawahara T, Murakami S, Noiri Y, Ehara A, Takemura N, Furukawa S et al. Effects of Cyclosporin-A-induced Immunosuppression on Periapical lesions in Rats. J Dent Res 2004;83(9): 683-87.

37. Lee YL, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Lin YT, Chen MH et al. An Extract of Green Tea, Epigallocatechin-3- Gallate, reduces Periapical lesions by inhibiting Cysteine-rich 61 Expression in Osteoblasts. *J Endod* 2009; 35(2): 206-11.

38. Teixeira RC, Rubira CMF, Assis GF, Lauris JRP, Cestari TM, Rubira-Bullen IRF. Radiological and histopathological evaluation of experimentally induced periapical lesion in Rats. *J Appl Oral Sci* 2011; 19(5):500-4.

39. May KP, West SG, McDermott MT, Huffer WE: The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. *Arthritis Rheum* 1994; 37:201-206.

40. Kalantzis A, Marshman ZOE, Falconer DT, Morgan PR, Odell EW. Oral effects of low-dose methotrexate treatment *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:52-62.

41. Yamasaki M, Kumazawa M, Koshaka T, Nakamura H. Effect of methotrexate induced neutropenia on rat periapical lesion. *Oral surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:655-61.

42. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31(8):574-7.

43. Yang L, Zhang C, Peng B. Immunolocalization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in rat periapical lesions. *J Endod* 2009;35(6):834-7.

4.8 TABLE

Table 2- Mean size of the periapical lesions and analysis of matching control and experimental groups

Groups	Histological analysis	Mean size in mm (Minimum-maximum)	<i>P</i> [*] value
G1	No inflammatory reaction	No lesion	0.2
G2	Chronic inflammation mild	1.7 mm (1,3-1,9)	
G3	Chronic inflammation mild	1.5 mm (1,2-1,6)	
G4	Chronic inflammation moderate	1.65 mm (1,3-1,8)	
G5	Chronic inflammation mild	1.5 mm (1,2-1,7)	
G6	Chronic inflammation mild	1.6 mm (1,4-1,7)	
G7	Chronic inflammation mild	1.46 (1,1-1,5)	

^{*} *p* value resulting from the comparison between groups

4.9 FIGURES

Radiographic images

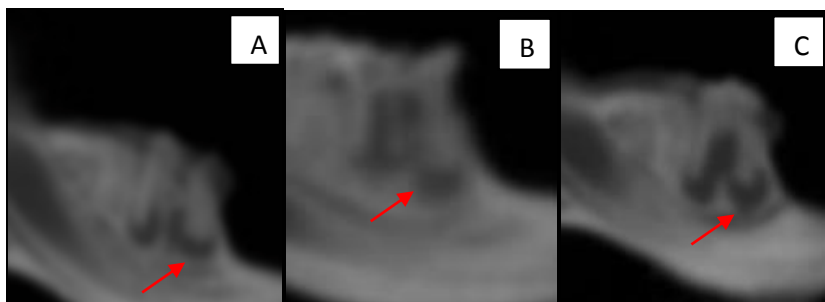


Figure 1: sagittal views of mandibular first rat molars **A)**An arrow indicate a

periapical lesion in a specimen of **G2**(1,7mm) **B)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G3**(1,5mm); **C)**An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G4**(1,65mm)

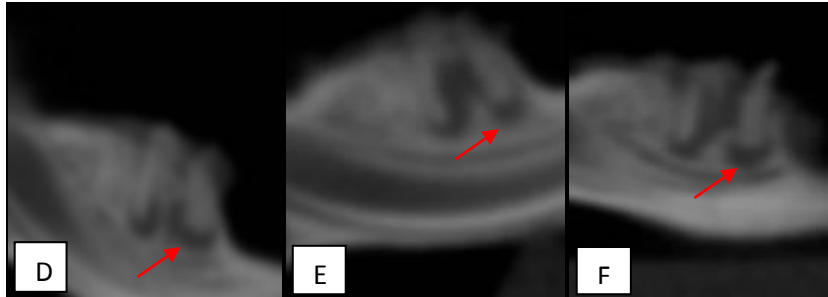


Figure 2: sagittal views of mandibular first rat molars **D)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G5**(1,5mm) **E)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G6**(1,6mm); **F)** An arrow indicate a periapical lesion in a specimen of **G7**(1,46mm).

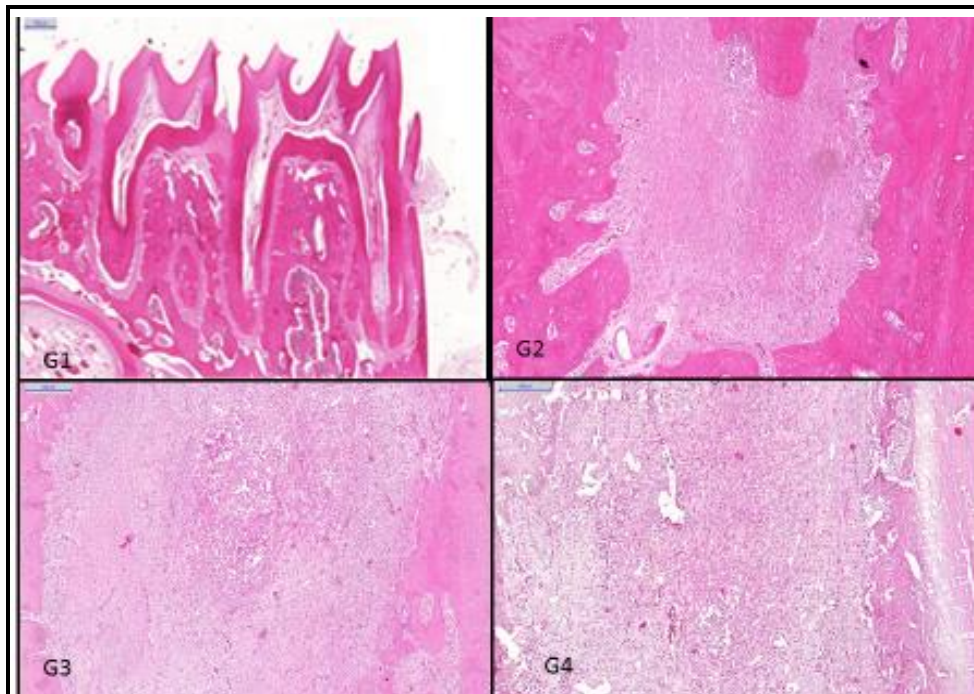


Figure 3: Histological findings in periapical regions. Groups: **G1** showed no inflammatory infiltration(HE , original magnification x500μm); **G2** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x200μm); **G3** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x200μm); **G4** showed moderate inflammatory infiltration);

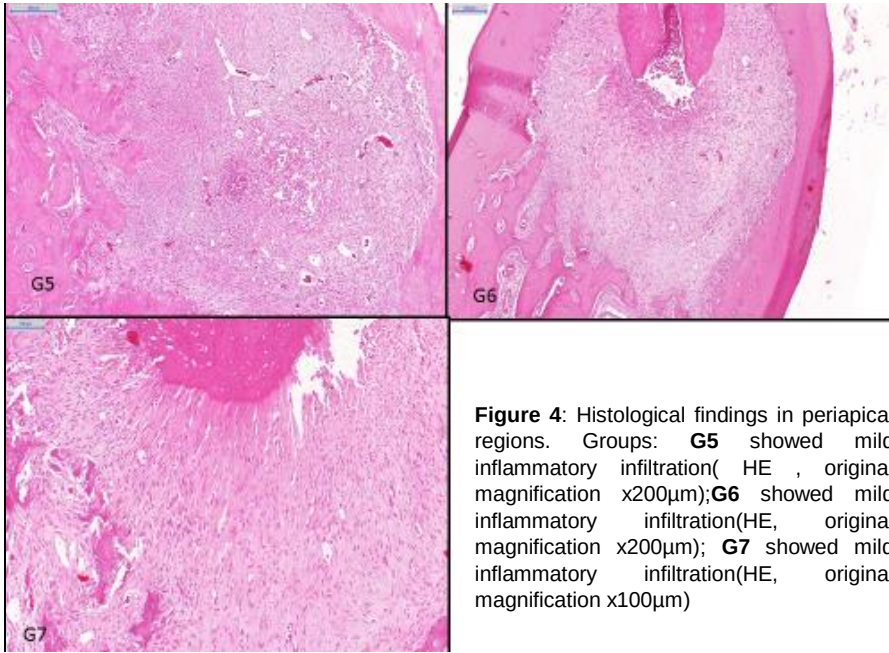


Figure 4: Histological findings in periapical regions. Groups: **G5** showed mild inflammatory infiltration(HE , original magnification x200μm);**G6** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x200μm); **G7** showed mild inflammatory infiltration(HE, original magnification x100μm)

5 CONCLUSÃO

O metotrexato em altas doses não influenciou significativamente a população de células inflamatórias na evolução das lesões periapicais crônicas. Consequentemente, o tamanho das lesões periapicais foram semelhantes entre os grupos.

REFERÊNCIAS

1. Franklin AL, Stokstad ELR, Jukes TH. Acceleration of pteroylglutamic acid deficiency in mice and chicken by a chemical antagonist. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*1947;65:368
2. Lacasce AS. 2009. Therapeutic use of high-dose methotrexate. UpToDate On Line.[acesso em 27 mar 2014].Disponível em: http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=chemagen/5867&selecte dTitle=5%7E150&source=search_result.
3. Kakehashi S, Stanley H R, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ free and conventional laboratory rats. *O.S, O.M e O.P.* September 1965; v20.(3):340-49
4. Tagger M, Massler M. Periapical tissue reactions after pulp exposure in rat molars. *Oral Surg.* February 1975; 39(2): 304-316.
5. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and Gram negative Bacteria in the rat periapical lesions. *Journal of Endodontics.* October 1992;18(10):501-504
6. Hirakata Y, Furuya N, Matsumoto T, Tateda K, Yamaguchi K. Influence of various immunosuppressive agents on the occurrence of endogenous bacteremia in mice.*J Med. Microbiol*1995;42:181-185
7. Nossa PM. Avaliação histológica da atividade antiinflamatória de extratos etanólicos de *Serjania erecta* e *Zeyheria montana* [Dissertação de Mestrado].Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto(UNAERP); 2008.
8. Silva LA, Hetem S, Denardin OVP. Efeito do metotrexato sobre o reparo ósseo após condilectomia unilateral em camundongos (*Mus musculus*).*Rev de Odontologia da UNESP* 2006;35(1): 89-96
9. Yamasaki M, Kumazawa M, Koshaka T, Nakamura H. Effect of methotrexate induced neutropenia on rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* June1994;77:655-1.
10. Brunton L L, Lazo J S ,Parker, In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* Goodman e Gildman. McGraw-Hill Interamericana do Brasil: Rio de Janeiro, RJ. 2006. 11 ed. p.1203-1207.
11. Borelli A L. Alterações Morfológicas do periodonto de sustentação em ratos tratados com methotrexate.[tese Doutorado].São Paulo: Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo;2001

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma Vancouver

12. Bressan A L, Fontenelle E, Gripp A C, Silva R S. Imunossupressores na Dermatologia. *An Bras dermatol*.2010; 85(1): 9-22
13. Goodman LS; Gilman GA; Rall TW; Murad F ,In: Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da Terapêutica.10ªed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2005
14. Howard A, Pelc SR. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity (supl)* 1953; 6: 261-73.
15. Genestier L; Paillot R; Quemeneur L; Izeradjine K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 2000; 2-3: 247-57.
16. Perlis C, Pan TD, McDonald CJ. Cytotoxic agents. In: *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*. Wolverton SE.China: Saunders elsevier;2007.p 197-217.
17. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L et al. Methotrexate for the treatment of Chron's disease. The North American Chron's study group investigators.*N Engl J Med*.2;332(5):292-7, 1995
18. Cavalcanti SCXB, Correa L, Luz JGC. Facial symmetry evaluation after experimentally displaced condylar process fracture in methotrexate treated rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 2012 ;27(3): 211-16
19. Fabbri L, Caramori G, Cosma P, Ciacia A. Methotrexate in the Treatment of Systemic Glucocorticoid-Dependent Severe Persistent Asthma : a Word of Caution. *Am Rev Respir Dis* 1991;143 (1): 179-81.
20. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007; 65(3): 168-73.
21. Alves APNN, Pessoa C do O, Lotufo LC, Moraes Filho MO. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and methotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. *Acta Cirurg Bras* 2007;v22(6):457-62
22. Heimdahl A, Mattsson T, Dahllöf G, Lönnquist B, Ringdén O. The Oral cavity as a port of entry for early infections. *Oral Surg oral Med Oral Pathol* Dec1989;68(6):711-6.
23. Maurmann, J H. Pyrhönen S,Teerenhovi L, Lindqvist C. Oral sources of septicaemia in patients with malignancies. *Oral Oncology* Nov1997;33(6):389-97
24. Epstein JB, Chow AW. Oral complications associated with immunosuppression and cancer therapies. *Infect Dis Clin North Am* Dec1999;13(4):901-23

25. Loureiro CCS. Adde CA. Perez FEG. Penha SS. Efeitos adversos de medicamentos tópicos e sistêmicos na mucosa bucal. Rev Bras Otorrinolaringol jan-fev 2004; 70(1):106-11.
26. Kreuger MRO, Savoldi LW;Hoffman S,Diegoli NM. Complicações orais em pacientes em tratamento quimioterápico na UNACON, no município de Itajaí/SC.FOL-Faculdade de Odontologia de Lins/Unimep dezembro 2008.Programa de Iniciação Científica Artigo 170/ Governo do estado e santa Catarina/Univali
27. Lopez B C. Oral Toxicity produced by chemotherapy: A systemic review. J Clin Exp Dent 2014 ; 6(1): 81-90.2014
28. Wong, M H. Oral complications and management Strategies for patients Undergoing Cancer therapy. Scentific World Journal. v 2014
29. Mattson T,Heimdahl A,Dahllöf G,Lönquist B, Ringdén O. Oral and nutritional status in allogeneic marrow recipients treated with T-cell depletion or cyclosporine combined with methotrexate to prevent graft- versus- host- disease.Oral surg Oral med Oral Pathol jul1992; 74(1):34-40
30. Puricelli E, Haddad AS,Ponzoni D, Munaretto JC. Preliminary histological analysis of methotrexate- induced oral mucositis: experimental study in mice. RFO. maio/ago 2011;16(2):144-148
31. Lopez-Galindo MP, Bágan JV,Jimenez Soriano Y, Alpiste F Campos c. Clinical evaluation of dental and periodontal status in a group of oncological patients before chemotherapy.Med Oral Patol Oral Cir Bucal.2006;11E7
32. Chan CW et al. Oral complications in Chinese cancer patients undergoing chemotherapy.Suport care cancer 2003;1:48-55.
33. Kalantzis A, Marshman ZOE, Falconer DT.Oral urg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 2005.100:52-62.
34. Bathon JM; Martin RW; Fleischmann RM;Tesser JR; Schiff MH et all.A comparison of Etanercept and methotrexate in patients with early Rheumatoid arthritis. The new England Journal of Medicine.v343.Nov30.2000.
35. Moreira AL; Miguelote R; Coelho T H;Bruno J.Hemograma Texto de Apoio. Ano lectivo . Faculdade de Medicina do Porto 2001/02.
36. Buhroo A M e Baba A N. Adverse effects of Low Dose Methotrexate in Patients with Rheumathoid Arthriths. IJPMR October 2006;17(2): 21-25.
37. Nikoskelain J. Oral Infections related to radiation and Immunosuppressive therapy.J Clin Periodontol 1990;17:504-507
38. Yu S M, Stashenko P. Identification of inflammatory Cells in Developing Rat Periapical lesions. Journal of Endodontics nov 1987;13(11):545-40.

39. Stahshenko P; Teles R; D'Souza R. Periapical Inflammatory Responses and their modulation. Crit Rev Oral Biol Med.9(4):498-521.1998
40. Zeller JM, Cunera MB, Gudewicz PW. Effects of high dose methotrexate on rat alveolar and inflammatory macrophage populations. 1984; Inflammation 8(3): 231-239.
41. Watermann Jr PA. Development of Periradicular lesions in immunosuppressed rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:720-5
42. Glickman I, Shklar G. The effect of systemic disturbances on the pulp of experimental animals. Oral surg 1954;7:550
43. Kolzet DJ, Shklar G, Krakow AA, Gron P. Pulpal responses to operative procedures in rats receiving systemic methotrexate. Oral Surg Nov 1979.
44. Nakamura K, Yamasaki M, Nishigaki N, Iwama A, Imaizumi I, Nakamura H et al. Effect of methotrexate induced neutropenia on pulpal inflammation in rats. J Endod 2002;28(4):287-90
45. Willoughby DA, Giroud JP. The role of polymorphonuclear leucocytes in acute inflammation in agranulocytic rats. J Pathol 1969;(98):53-59
46. Rylander H. Acute inflammation and granulation tissue formation in neutropenic rats. Odontol Revy 1974 25: 147-56
47. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. J Endod. 1992;18(9): 422-6
48. Yamasaki M, Kumazawa M, Koshaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and Periapical Tissue Reactions after Experimental Pulpal Exposure in Rats. Journal of Endodontics January 1994; 20(1).
49. Zhang YH; Heulsmann A; Mehrdad M; Tondravi; Mukherjee; Abu Mer, Y. Tumor necrosis Factor α (TNF) stimulates RANKL-induced Osteoclastogenesis via coupling of TNF Type1 Receptor and RANK signaling Pathways. The Journal of Biological Chemistry. January 2001 276.(1).p 563-568.
50. Stashenko P, Wang C, Tani-Ishi N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. Oral Surg 1994; 78:494-502
51. Lucisano MP. Avaliação de lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos Knockout para molécula adaptadora para ativação de receptores toll-like(MyD88). [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto, 2013
52. Kawashima N ; Stashenko P. Expression of bone resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. Archives of Oral Biology 1999;44:55-66.
53. Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. Oral Microbiol Immunol 1993;8: 50-56.

54. Wang CY; Tani-Ishi N; Stashenko P. Bone resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol* .12: 65-71.1997
55. Zhang X;Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NK Kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod*. 2005,31(8): 574-7.
56. Liu L, Peng B. The expression of macrophage Migration Inhibitory Factor is correlated with Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand in Induced Rat Periapical lesions. *JOE* 2013;39(8):984-90.
57. Kawashima N,Okiji T,Kosaka T, et al. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod* 1996;22:311-6.
58. Teitelbaum S. Bone resorption by osteoclasts. *Bone remodeling and repair.Science*.Sept 2000;(289):1504-1508
59. Consolaro A. Periapicopatias: etiopatogenia e inter-relações dos aspectos clínicos, radiográficos e microscópicos e suas implicações terapêuticas. In: Leonardo, MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. 3ªed.902p;p77-102.São Paulo: Pan americana,1998.

ANEXOS

ANEXO A

Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

- **General Points on Composition**
- **Organization of Original Research Manuscripts**
- **Manuscripts Category Classifications and Requirements**
- **Available Resources**

General Points on Composition

1. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:
2. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
3. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors' names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium

hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983).” In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

4. Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.
5. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)
6. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.
7. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”
8. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.
9. Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or

papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

2. **Organization of Original Research Manuscripts**

Please Note: All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., *Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc.*, and should not exceed more than 250 words in length.

1. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.
2. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.
3. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing extensive review of the literature, and discussing the results of the study in this section.
4. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components to this section are the detailed description of the materials used and their components,

the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (e.g., antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an ***in vitro* model** to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the model, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

5. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. Author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (e.g., microarray data).
6. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., “A,” “B,” etc.), in order for the

reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (J Endod 2012;38:884–888); Olivieri et al., (J Endod 2012;38:1007–1011); Tsai et al (J Endod 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multipanel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for maximum number of allowable figures).

The second type of figures are graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

7. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

8. Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).
9. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do

these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions

10. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed
11. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the *JOE*. The *JOE* uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

3. Manuscripts Category Classifications and Requirements

Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:

1. CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at www.consort-statement.org/. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
2. Review Article-Manuscripts in this category are either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even when followed by extensive review of the literature will should be categorized as “Case Report/Clinical Technique”. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

3. Clinical Research (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.
4. Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.
5. Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables*.
6. Case Report/Clinical Technique (e.g., report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*.

* Figures, if submitted as multipanel figures must not exceed 1 page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require approval of the *JOE* Editor or associate editors. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at ***jendodontics@uthscsa.edu***.

Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.

Available Resources

Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X.

Day R. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN1-57356-164-9.

Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar)

Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.

Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.