

RAMEZ HASSAN MAHMOUD

**O impacto do montelucaste de sódio no processo de
reparo ósseo alveolar de camundongos tratados com ácido
zoledrônico**

**Araçatuba - SP
2024**

RAMEZ HASSAN MAHMOUD

**O impacto do montelucaste de sódio no processo de
reparo ósseo alveolar de camundongos tratados com ácido
zoledrônico**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Implantodontia.

Orientadora: Prof. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientadora: Prof. Assistente Claudia Cristina Bigueti

**Araçatuba - SP
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M215i Mahmoud, Ramez Hassan.
O impacto do montelucaste de sódio no processo de reparo ósseo alveolar de camundongos tratados com ácido zoledrônico/ Ramez Hassan Mahmoud. - Araçatuba, 2024
56 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto
Coorientadora: Profa. Claudia Cristina Bigueti

1. Camundongos 2. Araquidônico 5-Lipoxigenase
3. Eicosanóides 4. Osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos 5. Regeneração óssea
Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DEDICATÓRIAS

À Professora Shamira, minha mãe que jamais fraquejou diante das adversidades, que não foram poucas, para me direcionar no melhor caminho e oferecer tudo o que pôde. O maior orgulho para mim foi tê-la como exemplo de luta, de renúncia e abnegação. Filha de imigrantes árabes, mulher, concluiu o ensino médio técnico em magistério escondido dos pais, graduou-se em matemática pela Universidade Federal de Matogrosso já casada, com três filhas e grávida de mim em 1970. Trabalhou lecionando em dois turnos, auxiliava ao meu pai no comércio e ainda era mãe, esposa e dona de casa. Foram tantas as batalhas e vitórias dessa grande mulher que qualquer conquista minha representa um grão de areia no oceano de sua trajetória – Mãe, te amarei por toda a eternidade.

À minha irmã Sheila, cuja melhor forma para resumi-la é dizendo que sempre foi e continua sendo uma extensão de minha mãe, com o seu amor incondicional, a sua dedicação a todos os filhos, irmãos e sobrinhos. É a pessoa, sem nenhuma dúvida, que mais se orgulha das minhas conquistas e que mais se realiza com o meu bem-estar e sucesso profissional – Sheila, minha irmã, saiba que em nenhum momento da minha vida eu me senti sozinho e nem desamparado, tamanha é a segurança que o seu amor me dá.

Luciano, sem você nada do que realizei desde 2013 teria sido possível. Você me oferece sempre o melhor do seu coração. Obrigado por sua dedicação à nossa casa, nossa família e nossos projetos. Sua paciência tem sido um verdadeiro bálsamo para os momentos mais difíceis – Lu, dedico a você os méritos desse título.

Amigos, são tantos e bons amigos que sempre estiveram ao meu lado, torcendo e vibrando por cada momento feliz – Amigos, o amor de vocês me mantém querendo lutar contra o tempo para continuar no caminho do aprendizado e do aprimoramento, mesmo quando o peso dos 5.4 já começam a importar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À amiga, irmã, colega de graduação, parceira de clínica e orientadora Mariza Akemi Matsumoto, razão pela qual realizei o sonho de estar nessa pós-graduação. Pessoa que admiro e respeito, amiga para todos os momentos, cuja família me acolheu desde o início com profundo respeito e carinho. Como profissional, um exemplo de seriedade, comprometimento, competência, dedicação e principalmente ética para com o ensino, a pesquisa e alunos. Que Deus possa recompensar com saúde para você sua família por todo o bem que distribui por onde passa. Você é especialmente iluminada. Obrigado por tudo

À coorientadora Cláudia Cristina Bigueti, que no decorrer destes anos tornou-se uma amiga de tantas confidências e desabafos, mas que também muito me ensinou e encorajou a continuar – Obrigado pela paciência de ensinar a um profissional com tantos anos dentro da rotina clínica a ser um pouquinho cientista. Você foi muito paciente, sempre tendo muito cuidado comigo e se dedicando com amor a me orientar e aos nossos experimentos. Claudinha, eu te considero uma profissional diferenciada e que realmente faz a diferença na ciência, colaborando e construindo conhecimentos. Você já percorreu uma carreira brilhante até aqui, porém no seu caminho haverá surpresas maravilhosas, frutos do seu merecimento. Permita que eu possa me realizar um pouquinho por meio de você.

Aos colegas de pós-graduação e alunos de iniciação científica, pelo trabalho em equipe e por, muitas vezes, suprirem a minha ausência nas atividades de laboratório e biotério. Sinto-me muito agradecido e lisonjeado por estar no meio de vocês. Que Deus permita a cada um de vocês colher os frutos de tantas horas dedicadas aos estudos e aos trabalhos acadêmicos.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Ciências Básicas, especialmente aos, Prof^a Dr^a Alaíde Gonçalves, Prof. Assoc. Cláudio Aparecido Casatti, Prof^a Tit. Doris Hissako Sumida, Prof. Assoc. Edilson Ervolino, Prof. Tit. José Américo de Oliveira, Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Botacin, Prof. Tit. Dr^a Roberta Okamoto, Prof. Assoc. Roelf Justino Cruz Rizzolo e dos servidores técnico-administrativos Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, André Luís Mattos Piedade, Arnaldo César dos Santos, pelo apoio e viabilidade de execução dos experimentos laboratoriais e convivência enriquecedora.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2019/16067-3.

Ao Professor Ass. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto (FOA-UNESP), pela colaboração durante as pesquisas.

À Professora Claudia Cristina Bigueti (University of Texas at Rio Grande Valley - UTRGV), pelo intercâmbio de conhecimentos.

Ao Professor Assoc. Edilson Ervolino (FOA-UNESP), por suas preciosas orientações e direcionamentos.

A Professor Walid D Fakhouri (University of Texas at Houston - UTH).

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em especial à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, nas pessoas do diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e ao vice-diretor Prof. Assoc. Luciano Tavares Angelo Cintra.

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs

É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente

Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs

É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Todo mundo ama um dia
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora

Almir Sater

RESUMO

MAHMOUD, R. H. **O impacto do montelucaste de sódio no processo de reparo alveolar de camundongos tratados com ácido zoledrônico.** 2024. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Não raro, alguns medicamentos administrados sistemicamente para doenças diversas podem afetar a saúde dos tecidos bucais. Dentre eles destacam-se os da classe dos bifosfonatos, especialmente os nitrogenados (BFn), comprovadamente relacionados à instalação da osteonecroses dos maxilares. Vários fatores podem elevar o risco de seu acometimento, relacionados ao indivíduo como idade, sexo biológico, doença de base e relacionados à própria droga como potência, via de administração e dose. Sabe-se que o principal mecanismo dos BFn tem como alvo a via do mevalonato dos osteoclastos; no entanto, outros efeitos também são registrados, como alterações no sistema imunológico, o qual regula direta e indiretamente o metabolismo ósseo. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo analisar como a inibição de fatores da via da 5 lipoxigenase (5-LO) utilizando o montelucaste de sódio (MTK) para inibir o receptor do cisteinil leucotrieno 1 (CisLTR-1), e animais com modificação genética para esta enzima (*knockout*, denominados 5LOKO), afetam o processo de reparo de animais tratados com ácido zoledrônico (ZL). Foram utilizados 90 camundongos machos da linhagem 129Sv (WT, *wild type*, e 5-LOKO), com idades entre 12 e 16 semanas, divididos em grupos de acordo com o tratamento: WT-C e 5-LOKO – sem tratamento, WT-MTK – tratados com 4mg/Kg de MTK, WT-ZL – tratados com ZL, WT-MTK-ZL – tratados com MTK e ZL, 5LOKO-ZL – tratados com ZL. Todos os animais foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito e submetidos à eutanásia após 21 dias. O MTK foi administrado via oral na dose de 4mg/Kg uma vez ao dia via oral, iniciando 24 horas antes do procedimento cirúrgico. O ZL foi administrado na dose de 250 µg/Kg a cada 72 horas via IP, iniciando quatro semanas antes do procedimento cirúrgico e continuando até o final do experimento. Finalizado o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de sangue e das cabeças contendo os alvéolos em reparação, a fim de se realizar as análises em microtomógrafo computadorizado (microCT), bioquímicas, histológicas, de birrefringência e imunohistoquímica. A microCT revelou aumento significativo de BV/TV e Th.Tb nos grupos WT-ZL e WT-MTK-ZL em comparação com o WT-C e 5LOKO. No entanto, nos animais tratados com ZL a histologia mostrou a presença de trabéculas grosseiras, ora maduras, ora em maturação/remodelação, e persistência de infiltrado inflamatório difuso. A birrefringência revelou um aumento significativo de matriz colagenosa do espectro verde nos animais tratados com ZL, com exceção do WT-MTK-ZL. Porém, as fibras do espectro vermelho também se mostraram significativamente aumentadas nos animais WT-MTK, WT-ZL em comparação com o WT-C, e entre o 5LOKO-ZL e o WT-ZL. Na análise bioquímica houve aumento significativo de TRAPC nos animais 5LOKO em comparação aos demais, diferente da marcação imuno-histoquímica no local do reparo, onde o aumento de TRAP foi detectado nos grupos WT tratados com MTK e ZL associados ou isoladamente, em comparação com o WT-C, e entre o 5LOKO e os animais WT tratados. A FRAP mostrou-se significativamente aumentada nos grupos não tratados com ZL e o TBARS significativamente aumentado nos grupos WT tratados ou não em comparação com os 5LOKO tratados ou não. A partir dos resultados obtidos e considerando-se o modelo experimental, concluiu-se que, de modo geral, a inibição do CisLTR-1 pe

lo uso do MTK e a depleção genética da 5LO conferiu maior resistência à ação do ZL que nos animais WT, em cujos animais esta droga afetou negativamente o processo de reparo ósseo pós-exodontia, bem como a qualidade do tecido ósseo neoformado, aumentando a ação oxidante sistêmica.

Descritores: Bifosfonatos; 5-lipoxigenase; camundongos; eicosanoides; osteonecrose associada a bifosfonatos; regeneração óssea.

ABSTRACT

MAHMOUD, R. H. **The impact of montelukast sodium on the alveolar repair process in mice treated with zoledronic acid.** Thesis (Doctoral) – São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, 2024.

The influence of some systemic medicaments for the treatment of several diseases on the oral tissues is not a rare condition. Amongst them there are the bisphosphonates, especially those containing nitrogen (BPn), already proved to be related to the onset of the osteonecrosis of the jaws. Several factors can increase the risk of its development, as those related to the individuals themselves as the age, biological sex, base disease, and related to the drug itself, as its potency, administration route, and dosage. It is known that the main mechanism of action of the BPns targets the mevalonate pathway of the osteoclasts; however, other effects are related, as alterations in the immunological system, that directly or indirectly regulates bone metabolism. Considering this, the present study aimed to analyze how the inhibition of derivatives of the 5 lipoxygenase (5LO) pathway using the sodium montelukast (MTK) to inhibit the cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysTLR-1), and animals with genetic modification for this enzyme (knockout, here denominated 5LOKO), affect bone repair process of mice treated with zoledronic acid (ZL). Ninety 129Sv male mice were used (WT – wild type, and 5LOKO), age between 12 and 16 weeks, divided into groups according to the treatment: WT-C and 5-LOKO – no treatment, WT-MTK – treated with 4mg/Kg de MTK, WT-ZL – treated with ZL, WT-MTK-ZL – treated with MTK e ZL, 5LOKO-ZL – treated with ZL. All the animals underwent extraction of the upper right incisor and euthanized after 21 days. MTK was administered by mouth, 4mg/Kg, once a day beginning 24 hours before de surgery. ZL was administered via IP, 250 µg/Kg, every 72 hours, beginning four weeks before the surgeries. At the end of the experimental period, the animals were euthanized for blood collection and head removal with the healing sockets, to be analyzed under microcomputed tomography (microCT), biochemistry, histology, birefringence, and immunohistochemistry. MicroCT revealed significant increased BV/TV and Th.Tb in WT-ZL and WT-MTK-ZL in comparison with WT-C and 5LOKO. However, animals treated with ZL showed irregular trabeculae, some mature, some under maturation/remodeling, and persistent diffuse inflammation. Birefringence revealed significant increase of the green spectra in the animals treated with ZL, except WT-MTK-ZL. Nonetheless, red spectra fibers were also increase in the WT-MTK, WT-ZL groups in comparison with WT-C, and between 5LOKO-ZL and WT-ZL. Biochemistry showed significant increase in TRAPC in 5LOKO animals in comparison with the others, different from immunohistochemistry in the healing socket, where significant TRAP increase was detected in WT animals treated with MTK and ZL associated or not, in comparison with WT-C, and between 5LOKO and treated WT. FRAP was significantly increased in the groups not treated with ZL, and TBARs significantly increased in WT, treated or not, in comparison with 5LOKO, treated or not. From these results, and considering the experimental model, collectively it was concluded that CysTLR-1 inhibition using MTK e genetic depletion

of 5LO offered a higher resistant for the action of the ZL when compared with the WT animals, in which this drug negatively affected post-extraction bone repair, as well as the quality of the newly formed bone, increasing the systemic oxidative action.

Keywords: Bone repair; mice; 5-lipoxygenase; eicosanoids; osteonecrosis of the jaws.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Resultados estatísticos referentes às análises em micrCT dos alvéolos aos 21 dias após a exodontia. A) BV/TV (%), B) TB.TH (MM), C) TB.N (1/mm) e D) Tb.Sp (mm) 28
- Figura 2 - Cortes axiais do terço médio dos alvéolos após 21 dias da exodontia obtidas após escaneamento em aparelho SkyScan 1174v2, reconstruídos e realinhados pelos softwares NRecon e Data Viewer (Bruker, Kontich, Bélgica) para obtenção das imagens em 2D 28
- Figura 3 - Resultados estatísticos referentes às análises de concentração plasmática de (A) Fosfatase Alcalina, B) TRAP total, C) Cálcio, D) Fosfato, E) FRAP e F) TBARs. O símbolo * indica diferença com WT-C; δ indica diferença com WT-MTK; # indica diferença com 5LOKO; $\pm$ indica diferença entre WTs e 5LOKOs; letras minúsculas diferentes indica diferença entre os grupos com e sem ZL 30
- Figura 4 - Grupo WT-C – alvéolo preenchido por trabéculas ósseas em remodelação (*), ricamente celularizada em meio a medula constituída por tecido conjuntivo (#) frouxo vascularizado. WT-CV – trabéculas em remodelação (*) localizadas na periferia dos alvéolos. WT-MTK – notam-se trabéculas ósseas maduras (**) revestidas por células de revestimento (setas vermelhas), localizadas predominantemente na periferia dos alvéolos. Nas porções centrais, predomínio de tecido conjuntivo frouxo (#). WT-ZL – trabéculas ósseas irregulares (*), com lacunas ora irregulares, ora vazias (seta azul). WT-MTK-ZL - trabéculas irregulares e osteoclastos arredondados e não aderidos (seta preta). 5LOKO – presença de trabéculas ósseas em maduras. De permeio, observam-se discretos focos de infiltrado inflamatório mononuclear (setas azuis). Grupo 5LOKO-ZL – trabéculas ósseas maduras pobremente celularizadas (**), bem como deposição de matriz óssea primária e osteoclastos não aderidos e arredondados (seta preta) (HE; aumento original 2x e 100x) 33

Figura 5 - Resultados estatísticos referentes às análises de birrefringência 37
das fibras colágenas nos espectros verde (A) e vermelho (B). C –
Imagem dos cortes sob luz polarizada (Picrosirius-red; aumento
original 20x)

Figura 6 - Marcações imuno-histoquímicas para OCN, TRAP, COX-1 e COX- 39
2 e seus respectivos resultados estatísticos. O símbolo * indica
diferença com WT-C; □ indica diferença com WT-MTK; # indica
diferença com 5LOKO; letras minúsculas diferentes indicam
diferença entre os grupos com e sem ZL

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histológica comparativa entre os grupos analisados	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
°C	grau célsius
3D	tridimensional
5-LO	5-lipoxigenase
5LOKO	5 lipoxigenase knockout
AA	ácido araquidônico
AINEs	antiinflamatório não esteroideal
BPNs	bifosfonatos nitrogenados
<i>BRONJ</i>	<i>bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws</i>
BV/TV	fração de volume ósseo
C	Grupo Controle
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional Para o Controle da Experimentação Animal no Brasil
COX	cicloxigenase
CYP450	citocromo 450
CysLT	cisteinil leucotrieno
d	dia
ETs	ácidos epoxieicosatrienoicos
Fig.	figura
h	hora
HETEs	ácidos hidroxieicosatetraenólicos
IP	intraperitonia
IS	incisivo superior
Kg	quilograma
KV	kilovolt
LOX	lipoxigenase
LTs	leucotrienos
LXs	lipoxinas
Mg	miligrama
MicroCT	microtomografia
mm	milímetro
MTK	montelucaste

MTK2	Grupo Montelukaste 2mg/Kg/Dia
MTK4	Grupo Montelukaste 4mg/Kg/Dia
n	número de animais
OMAB	osteonecrose dos maxilares associado a bisfosfonatos
PGs	prostaglandinas
PVPI	polivinilpirrolidona 1%
ROIs	regiões de interesse
SF	solução fisiológica
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Sp	separação de trabéculas
Tb.Th	espessura de trabéculas
TXs	tromboxanos
uL	microlitro
WT	wild type
ZL	ácido zoledrônico
μA	microampere
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Animais de Experimentação	22
3.2 Tratamentos Farmacológicos	22
3.3 Procedimentos Cirúrgicos	22
3.4 Eutanásia dos Animais, Coleta, Fixação e Armazenamento das Amostras para Análise em MicroCT e Processamento Histotécnico para Microscopia	23
3.5 Coleta de Amostras e Análises dos Níveis Sérios de Fosfatase Alcalina (FAL), TRACP Total, Cálcio, Fosfato, FRAP e TBARs	24
3.6 Análises em MicroCT	25
3.7 Análise Microscópica Qualitativa (Histopatológica) e Quantitativa (Histomorfométrica)	25
3.8 Técnica de Imuno-Histoquímica	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Análise da Microarquitetura Óssea na Região de Reparo Alveolar pela Análise em MicroCT	27
4.2 Análise dos níveis séricos de FAL, TRACP, cálcio, fosfato, FRAP e TBARs	29
4.3 Análise Histopatológica	31
4.4 Análise de Birrefringência	36
4.5 Análises Imuno-Histoquímica	37
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO	56

1 INTRODUÇÃO

Os tecidos bucais podem ser afetados por uma série de alterações sistêmicas decorrentes de condições fisiológicas ou patológicas, ou ainda dos medicamentos a elas relacionados, influenciando seu metabolismo e capacidade de se recuperar de uma injúria. Assim, destacam-se os processos patológicos ósseos de caráter osteolítico cujos tratamentos associam drogas antirreabsortivas como os bifosfonatos nitrogenados (BPns) (Russell, 2011). A ação destes medicamentos na via do mevalonato dos osteoclastos resulta na redução da reabsorção óssea por meio da indução dessas células à apoptose ou diminuição da sua atividade, devido à alterações que ocorrem em seu citoesqueleto causando a inibição da formação da borda corrugada (Rogers *et al.*, 2011; Russell, 2011). De fato, os osteoclastos são considerados as células mais expostas aos BPns (Sato; Grasser, 1990; Sato *et al.*, 1991), embora atualmente saiba-se que estes fármacos apresentam outros efeitos intracelulares que podem afetar variados tipos celulares, como a inibição da farnesil pirofosfato sintase (FPP), importante para a função, por exemplo, de células inflamatórias, ocasionando em acúmulo do metabólito isopentenil pirofosfato (IPP), o qual parece ter efeitos imunomoduladores, ativando linfócitos T gama delta ($\gamma\delta$) em humanos (Russell, 2011) e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias como INF γ e TNF α (Endo *et al.*, 2017).

O uso dos BPns tem sido claramente associado ao desenvolvimento de um tipo particular de osteonecrose, denominada Osteonecrose dos Maxilares Associada ao uso de Bifosfonatos, do inglês *BRONJ – Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaws*), para a qual utilizaremos a abreviação OMAB. Clinicamente, trata-se de uma condição patológica definida inicialmente pela exposição de osso da maxila ou mandíbula na cavidade bucal, com ou sem infecção secundária, em pacientes que passaram ou estejam sob terapia antirreabsortiva e que não tenham sido previamente submetidos à radioterapia nestas regiões (Ruggiero *et al.*, 2014). Sua ocorrência depende basicamente de um fator desencadeador local, como procedimentos odontológicos invasivos que levam à exposição óssea (Mavrokokki *et al.*, 2007; Yalom *et al.*, 2007), embora também haja poucos relatos de ocorrência espontânea (Marx *et al.*, 2005). Ainda, de acordo com os consensos atuais sobre os estadiamentos da lesão, a exposição do tecido ósseo não é mandatória para o diagnóstico da OMAB, podendo haver osso não vital coberto por mucosa no estágio 0 das lesões,

acompanhado de dor intensa nos ossos das maxilas e mandíbula, odontalgia sem causa odontogênica, alteração sensorial, perdas dentárias não explicadas por causas periodontais, dentre outros achados clínicos. À medida em que as lesões progridem, o osso necrótico pode encontrar-se totalmente exposto ou comunicando-se com o meio intrabucal por meio de fístulas (estágio 1 e 2), ou em último caso (estágio 3), comunicando-se com seios maxilares ou região extraorais, além de apresentar fraturas patológicas, levando a importantes comorbidades (Khan *et al.*, 2017; Ruggiero *et al.*, 2014).

Há tempos que o papel de diferentes fatores inflamatórios na regulação e regeneração óssea vem sendo estudado, com diferentes enfoques, em particular considerando os efeitos de agentes farmacológicos já disponíveis no mercado e utilizados clinicamente sobre o reparo de fraturas, defeitos ósseos e incorporação de biomateriais (Matsumoto *et al.*, 2008, 2009; Moreschi *et al.*, 2013; Mountziaris; Mikos, 2008). A modulação da resposta inflamatória é um fator essencial para o favorecimento do processo de reparo ósseo (Bigueti *et al.*, 2018a; Thimmappa; Girod, 2010), uma vez que a liberação equilibrada de mediadores pró e anti-inflamatórios leva a um ambiente adequado para a formação e a maturação do tecido ósseo no local da injúria, o que favorece o reparo (Bigueti *et al.*, 2018b; Mountziaris; Mikos, 2008).

Especificamente, a maior parte dos trabalhos sobre os agentes farmacológicos anti-inflamatórios foca no impacto dos imunomoduladores clássicos (ex: drogas anti-inflamatórias não esteróides, AINEs) sobre a formação óssea durante o reparo, em virtude da inibição indireta da produção de eicosanóides, principalmente prostaglandinas (PGs). Neste contexto, estes estudos levam em conta principalmente a possível inibição dos papeis anabólicos das ciclooxigenases (COX) e seus subprodutos sobre as células ósseas, de modo que a utilização de AINEs clinicamente poderia ter um efeito importante sobre o reparo ósseo subsequente à inflamação (Manigrasso; O'Connor, 2010; Mountziaris; Mikos, 2008).

Quando o ácido araquidônico (AA) é liberado a partir da membrana lipídica por meio da ação da enzima fosfolipase A2 (FLPA2) pode ser imediatamente repostado à membrana pelo ciclo de Lands, ou então, seguir para vias metabólicas das COXs e das lipoxigenases (LO), ou mesmo do citocromo P450, sendo processado em diferentes mediadores químicos (O'Connor *et al.*, 2014). Especialmente, no contexto

da resposta inflamatória, chama-se atenção para ação das enzimas COX-2 e 5-LO, as quais geram eicosanóides para o local da injúria. Resumidamente, os produtos liberados por ambas as enzimas na resposta inflamatória, contribuem em grande parte para deflagrar sinais flogísticos da resposta inflamatória junto a outros mediadores celulares locais e/ou mediadores plasmáticos (Sud'ina *et al.*, 2008). Entretanto, além de deflagrar os eventos vasculares da inflamação, os eicosanóides (principalmente os leucotrienos, produzidos a partir da 5-LO) também estão envolvidos com a quimiotaxia de diferentes leucócitos, tais como monócitos/macrófagos, células importantes da deflagração da resposta imune/inata e regulação da reparação óssea subsequente, incluindo a remodelação e maturação óssea (Claes; Recknagel; Ignatius, 2012; Lange *et al.*, 2013; Loi *et al.*, 2016).

Considerando-se particularmente o papel das COXs e 5-LO sobre o reparo de feridas ósseas ou mesmo remodelação deste tecido em outras situações, estudos por meio de marcação imunohistoquímica ao longo do reparo de fraturas em ossos longos tem demonstrado que ambas são altamente expressas em diferentes fases do reparo (Lin; O'Connor, 2014). Outros trabalhos de causa e efeito utilizando camundongos geneticamente modificados (*Knockouts*, KO) têm se mostrado bem elucidativos (Lin; O'Connor, 2014; Manigrasso; O'Connor, 2010; O'Connor *et al.*, 2014). Por exemplo, enquanto camundongos COX-1KO ou camundongos WT tratados com AINEs não apresentam diferenças na formação de tecido ósseo durante o reparo de fraturas, comparando-se a camundongos WT (*do inglês Wild Type*), camundongos COX-2KO apresentam menores quantidades de cartilagem, osso, bem como reduzidas propriedades biomecânicas das regiões de reparo em relação aos animais COX-1KO e WT (O'Connor *et al.*, 2014). Outras evidências reforçam que as COXs, por meio da produção de PGEs, tem um papel anabólico sobre os osteoblastos, confirmando, portanto, seu papel positivo na neoformação óssea e adicionalmente sobre a angiogênese (O'Connor *et al.*, 2014; Simon; O'Connor, 2007).

Por outro lado, a enzima 5-LO, parece ter um papel mais decisivo sobre a osteoclastogênese, estimulando a mesma e, portanto, tendo um efeito catabólico sobre o tecido ósseo (Bonewald *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 1996). A 5-LO catalisa a conversão do AA em dois grupos principais de leucotrienos: LTB₄ e cisteinil leucotrieno (CisLT), os quais atuam via dois receptores acoplados à proteína G. Uma das funções do receptor-1 de CisLT (CisLTR1) é a indução do sinal de Ca²⁺

intracelular. No início da osteoclastogênese, o RANKL aumenta a concentração de Ca^{2+} no interior das células precursoras dos osteoclastos, ativando o fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), principal fator de transcrição dos genes osteoclásticos, pela fosfatase calcineurina e deste modo, regulando a formação dos osteoclastos via sinalização deste íon (Kang *et al.*, 2015).

Assim, a COX-2 e a 5-LO exercem efeitos distintos, sendo a COX-2 considerada essencial para a reparação óssea, enquanto a 5-LO parece ser deletéria para este processo. Sugere-se ainda que a inibição medicamentosa da via COX desviaria a metabolização do ácido araquidônico para a via 5-LO, produzindo altos níveis de leucotrienos (Martel-Pelletier *et al.*, 2004) o que poderia também, influenciar de forma negativa o processo de reparo ósseo, frente às evidências aqui apresentadas. Considerando especialmente a enzima 5-LO sobre o reparo ósseo, Bonewald *et al.* (1997) e Manigrasso e O'Connor (2010) demonstraram por meio de estudos com camundongos modificados geneticamente para essa enzima (denominados 5-LOKO), um fenótipo ósseo com espessamento da cortical e processo de reparo mais acelerado de fratura de fêmur nestes animais comparados a camundongos WT. No entanto, o reparo de ossos endocondrais difere dos intramembranosos, ocorrendo por meio da formação intermediária de uma cartilagem e influenciado positivamente por uma série de mediadores presentes na abundante quantidade de medula óssea proveniente desses ossos, o que não mimetiza o processo de reparo ósseo intramembranoso na região craniofacial, como demonstrado por modelos comparativos em camundongos (Biguetti *et al.*, 2018a; Mouraret *et al.*, 2014).

A partir da década 2020, investigações acerca do papel da 5-LO no metabolismo e reparo de ossos intramembranosos, especificamente os alvéolos dentários utilizando camundongos geneticamente modificados para esta enzima (5LOKO) começaram a ser realizadas, pela particularidade destes ossos e a necessidade de se promover um reparo ósseo mais favorável para fins de reabilitação dentária (Mahmoud *et al.*, 2021; Simionato *et al.*, 2021). Entretanto, para uma possível correlação clínica, a modificação genética torna-se um fator limitante, sendo necessário uma alternativa aplicável como a utilização de uma droga, por exemplo. O montelucaste de sódio (MTK) é um antagonista do CisLTR-1 utilizado para o controle e tratamento de doenças das vias aéreas superiores como asma e bronquite

(Bousquet et al., 2009; Wang et al., 2023). Devido às evidências sobre sua ação na regulação da diferenciação e função nos osteoclastos (Wei et al., 2018; Zheng et al., 2018), e escassos relatos de reações adversas, esta tem sido uma droga de escolha para atuar como inibidora da síntese da via 5-LO de modo experimental. Estes efeitos puderam ser confirmados em estudo realizado por Ribeiro et al. (2023), onde observou-se o efeito dose dependente deste medicamento sobre o reparo ósseo intra-alveolar, acelerando o processo de reparo, e no esqueleto de camundongos 129Ev/Sv, melhorando a qualidade do fêmur e coluna vertebral. A partir do conhecimento das ações do MTK e dos BFns sobre o tecido ósseo propôs-se o presente estudo, a fim de se observar se a capacidade de acelerar o reparo ósseo pelo MTK, bem como pela depleção da 5-LO, seriam fatores de prevenção para um possível desenvolvimento de OMAB ou de promoção da neoformação óssea, nos animais tratados previamente com o BFn ácido zoledrônico. A hipótese nula é a de que a inibição da via da 5-LO não exerceria efeito sobre o processo de reparo nos animais tratados com o ácido zoledrônico.

2 OBJETIVOS

Analisar o impacto favorável ou desfavorável da droga inibidora do receptor de CisLT-1, o montelucaste de sódio, sobre o processo de reparo ósseo alveolar de camundongos tratados com ácido zoledrônico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (CEUA-FOA/UNESP #0599-2021) (Anexo 1). Foram utilizados 90 camundongos 129Sv-WT (*Wild Type*) e 129Sv-5LOKO (*Alox5^{tm1Fun}*), *knockouts* para a 5-LO, machos, com idade aproximada de 12 a 16 semanas, sendo estes animais caracterizados como adultos jovens (provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP) mantidos no biotério da FOA/UNESP, em ambiente com controle de ciclos de claro e escuro de 12/12 horas e temperatura controlada de 22°C $\pm$ 2°C.

3.2 Grupos Experimentais e Tratamentos Farmacológicos

Os animais foram distribuídos em grupos (n=15), de acordo com o tipo e tratamento experimental, como se segue: WT-C – Controle, sem tratamento, WT-MTK – tratados com montelucaste de sódio (MTK), WT-ZL – tratados com ácido zoledrônico (ZL), WT-MTK-ZL – tratados com MTK e ZL, 5LOKO – Controle, sem tratamento, 5LOKO-ZL – tratados com ZL. Os animais tratados com o MTK (#10008318, Cayman Chemical Company) receberam a dose de 4mg/Kg uma vez ao dia por via oral iniciando um dia antes do procedimento cirúrgico em horário determinado para que no dia da extração dentária, o medicamento fosse administrado uma hora antes da mesma, continuando neste mesmo horário pelos dias subsequentes até o dia da eutanásia (dia 21 pós-exodontia), totalizando 22 doses em todo o experimento. Para tratamento com ZL, utilizou-se a formulação laboratorial da Sigma-Aldrich (#SML0223) diluído em solução fisiológica, administrado na dose de 250 ug/Kg a cada três dias, via IP. Foram administradas 10 doses antes do procedimento de exodontia do incisivo superior (IS) direito, continuando até o período de eutanásia com 7 doses pós-exodontia, totalizando 17 doses em todo o experimento, cuja dose cumulativa foi de 4,25 mg/Kg para cada animal tratado.

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

Para a execução do modelo proposto, os animais foram previamente submetidos à sedação profunda administrada via intraperitoneal (IP), utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina a 10% (75 mg/kg - Dopalen®, Agribrands do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina 2% (10 mg/kg - Anasedan®, Agribrands do Brasil LTDA), compondo os grupos, de acordo com o protocolo medicamentoso descrito acima. Para o procedimento de exodontia, foi realizada uma incisão sulcular ao redor do dente incisivo superior (IS) direito com micro lâmina de bisturi (Fine Science Tools®). Em ato contínuo, realizou-se divulsão da mucosa inserida com auxílio de uma sonda exploradora adaptada, conforme previamente descrito, a mesma utilizada para luxação e extração propriamente dita (Biguetti *et al.*, 2018b). O dente extraído foi cuidadosamente analisado para verificação da presença da papila dentária. Posteriormente, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico 0,9% estéril.

Para fins comparativos e considerando o estresse gerado nos animais medicados, especialmente com o MTK cuja administração foi feita por 20 dias consecutivos, inserimos um grupo à parte denominado WT-CV (WT-Controle Veículo), os quais receberam soro fisiológico 0,9% via oral, diariamente, semelhante aos animais tratados com MTK. No entanto, este grupo não foi utilizado para fins de comparação em todas as metodologias como pode ser observado no item Resultados desta tese. Devido a isto, no momento da confecção do manuscrito para publicação, este grupo não será considerado ou será excluído somente da análise bioquímica, uma vez que para sua execução, há a necessidade de se analisar todas as alíquotas de todos os grupos no mesmo momento para evitar vieses de interpretação.

3.4 Eutanásia dos Animais, Coleta, Fixação e Armazenamento das Amostras

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de sedação com anestésico cloridrato de quetamina a 10% (250mg/Kg) via IP, seguido de decapitação com guilhotina para pequenos roedores, seguindo-se as normas vigentes pelo CONCEA. Imediatamente após a decapitação, foi coletado uma média de 2 ml de sangue de cada animal, imediatamente transferidos para tubos heparinizados a fim de se obter o plasma por centrifugação (1.000 x g, 4º C, por 10 minutos) e armazenadas em freezer

a -80°C onde aguardaram até o momento da realização dos ensaios bioquímicos. As maxilas foram coletadas e dissecadas, imediatamente imersas em frascos individuais contendo formalina a 10% tamponada, lavados em água corrente após 48 horas do processo de fixação, e acondicionados em álcool 70° a fim de serem submetidos ao escaneamento em microtomógrafo computadorizado (microCT). Finalizadas as capturas de imagem e escaneamentos dos espécimes ósseos em microCT, eles foram novamente lavados e acondicionados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 10 trocas aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com navalha. Então, as amostras foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica (Synth, Diadema, Brasil). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados de 5µm de espessura no sentido axial no terço médio dos alvéolos, utilizando-se micrótomo (Leica RM, São Paulo, Brasil) para serem corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius Red, bem como para técnica imunohistoquímica.

3.5 Coleta de Amostras e Análises dos Níveis Séricos de Fosfatase Alcalina (FAL), TRACP Total, Cálcio, Fosfato, FRAP e TBARs

A descrição das análises para verificação dos níveis de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e TRACP pode ser conferida em Ribeiro et al. (2021). Optou-se por analisar o estresse oxidativo dos animais sob os tratamentos propostos, uma vez que há informações sobre a relação entre estresse oxidativo e o uso de ZL (Taniguchi et al., 2020). Assim, a capacidade antioxidante total do plasma foi determinada usando o ensaio FRAP, conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (1996), baseado na redução de Fe³⁺ a Fe²⁺, que é quelado por 2,4,6-tri(2-piridil)-s- triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe²⁺-TPTZ com absorvância máxima em 593 nm. Os resultados foram calculados usando uma curva padrão construída por meio de diferentes concentrações de soluções de FeSO₄. Os resultados foram expressos em mmol/L Fe²⁺. Os produtos da peroxidação lipídica foram determinados com base nos níveis de TBARs, o que resultou na produção de MDA, como principal produto dessa reação. TBARs plasmático foi medido como descrito anteriormente (Buege; Aust,

1978). Resumidamente, alíquotas foram misturadas com 15% (p/v) de ácido tricloroacético mais 0,375% (p/v) de ácido tiobarbitúrico e aquecidas a 100°C por 15 min. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, centrifugadas a 1000×g por 15 min, e sua absorbância foi medida em 532 nm. A quantidade de TBARs foi calculada usando o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.6 Análises em MicroCT

Após o processo de fixação, as cabeças dos animais foram acondicionadas em álcool 70° para o escaneamento dos alvéolos em reparação em equipamento de microCT (SkyScan 1272, Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP, a 50 kV, 800 μA , com filtro de alumínio de 0,5 mm, 180° de rotação e 1° de exposição, com 14 μm de resolução. Posteriormente, as imagens foram reconstruídas com o software nRecon, realinhadas no software Data Viewer na direção sagital, e utilizado o software CTAnalyzer para a quantificação dos parâmetros das trabéculas formadas no interior dos alvéolos (Bouxsein, Boyd et al. 2010). As imagens mais representativas de cada grupo foram reconstruídas com o software CTVox. As imagens obtidas a partir do escaneamento, foram reconstruídas e analisadas por meio do software CTAnalyzer (SkyScan). Para a quantificação de diferentes parâmetros trabeculares: volume ósseo (BV/TV, %), número de trabéculas (Tb.N, mm), espessura (Tb.Th, mm) e separação de trabéculas (Tb.Sp, mm), foi selecionada uma região de interesse (ROI) de 1x1mm. Para definição de regiões de interesse, foram utilizadas padronizações previamente estabelecidas na literatura (Gao *et al.*, 2015; Komatsu *et al.*, 2015). Os dados obtidos após a quantificação dos parâmetros trabeculares foram submetidos à tratamento estatístico.

3.7 Análise Microscópica Qualitativa

A análise qualitativa dos defeitos foi realizada em todos os cortes coronais na região média dos alvéolos corados em HE, considerando-se o grau de maturação do tecido ósseo, além do padrão do infiltrado inflamatório, reação tipo corpo estranho, neoformação, maturação, remodelação e viabilidade óssea.

3.8 Técnica de Imunohistoquímica

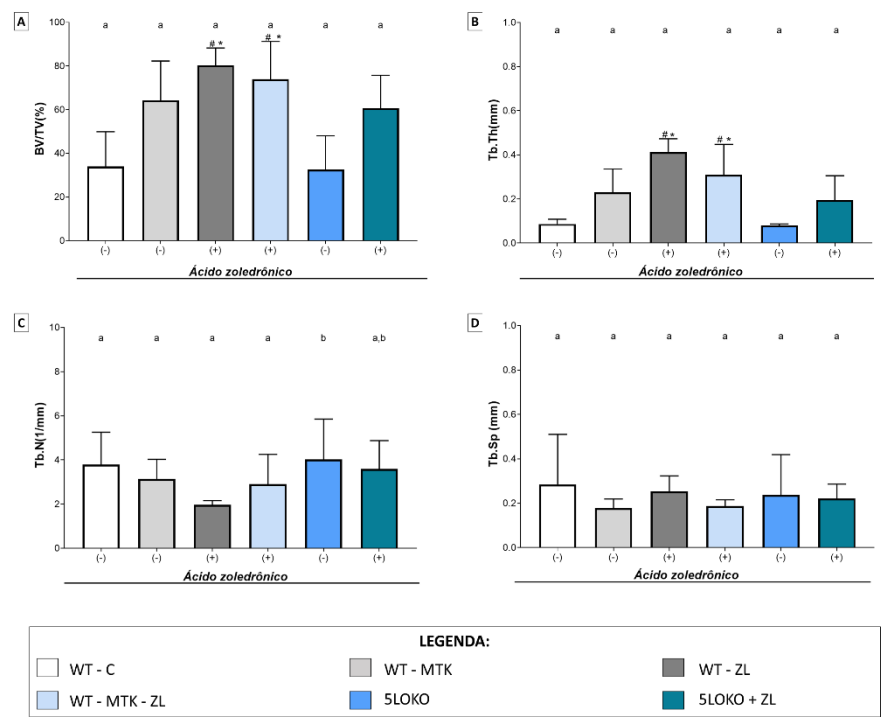
Com objetivo de determinar a localização e quantificar determinados tipos celulares e/ou marcadores de reparo e inflamatórios nas regiões de interesse, foi utilizada técnica de imuno-histoquímica para identificação dos marcadores ósseos para OCN (#18319, Santa Cruz Biotechnology, Carpinteria, EUA), TRAP (#30832, Santa Cruz Biotechnology, Carpinteria, EUA) e inflamatórios COX-1 (#19998, Santa Cruz Biotechnology, Carpinteria, EUA) e COX-2 (#1747, Santa Cruz Biotechnology, Carpinteria, EUA). Para tanto, os cortes parafinados foram tratados com proteinase K por 30 minutos em temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, os cortes foram incubados com os anticorpos primários em ambiente refrigerado por 24 horas, sendo os cortes posteriormente lavados com PBS por 5 minutos, por três vezes. Posteriormente, os cortes foram incubados com o polímero Immpress/HRP Horse anti-goat (Vector Labs, Southfield, EUA), considerando a reatividade dos anticorpos primários. Para controle negativo foram omitidos os anticorpos primários. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris. A marcação imunohistoquímica foi quantificada pelo Aperio Image Scope v 12.3.3 (Leica Biosystems, Buffalo Grove, EUA) utilizado para análises imuno-histoquímicas em patologia. As imagens analisadas selecionando-se o algoritmo Positive Pixel Count. As marcações positivas fortemente marcadas foram calculadas e os resultados expressos como positivo (número de pixels fortemente positivos/número total).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da Microarquitetura Óssea na Região de Reparo Alveolar pela Análise em MicroCT

Os dados referentes às análises obtidas a partir das microtomografias foram tabulados e submetidos ao software estatístico GraphPad Prism8 (GraphPad, San Diego, CA). Inicialmente, os dados foram avaliados quanto a distribuição de normalidade pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Comparações entre dados não paramétricos foram feitas utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido por múltiplas comparações pelo teste de Dunn's. Os valores obtidos foram considerados de acordo com o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) para todos os testes. A porcentagem de volume ósseo por tecido total (BV/TV) mostrou-se maior nos grupos com ZL, WT-ZL ($80,39 \pm 7,87$) e WT-MTK-ZL ($74,02 \pm 17,26$), em comparação com os grupos controle WT ($33,99 \pm 15,9$) e 5LOKO ($32,51 \pm 15,53$) ($p = 0,0003$). O mesmo padrão foi observado em relação a espessura das trabéculas, observando uma média de espessura maior nos grupos com ZL, WT-ZL ($0,4133 \pm 0,05989$) e WT-MTK-ZL ($0,31 \pm 0,1375$), em comparação com os grupos controle WT-C ($0,08667 \pm 0,0216$) e 5LOKO ($0,08 \pm 0,007071$) ($p < 0,0001$). Em relação ao número de trabéculas, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre os grupos administrados com ZL, observando-se um número maior de trabéculas no grupo 5LOKO ($3,593 \pm 1,285$) em relação ao grupo WT-ZL ($1,965 \pm 0,1946$) ($p = 0,0239$). Por fim, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no parâmetro de distância entre as trabéculas (Tb.Sp) ($p > 0,05$) (Figuras 1 e 2).

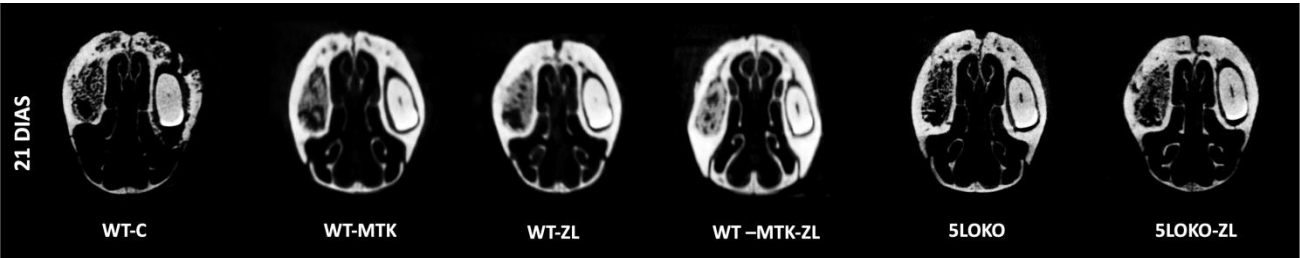
Figura 1 - Resultados estatísticos referentes às análises em micrCT dos alvéolos aos 21 dias após a exodontia. A) BV/TV (%), B) Tb.TH (MM), C) Tb.N (1/mm) e D) Tb.Sp (mm)



* Diferença em relação ao controle WT sozinho
diferença em relação ao controle SLOKO
Letras diferentes: diferença entre os grupos dentro do com e sem ZL

Fonte: Autor, 2024

Figura 2 - Cortes axiais do terço médio dos alvéolos após 21 dias da exodontia obtidas após escaneamento em aparelho SkyScan 1174v2, reconstruídos e realinhados pelos softwares NRecon e Data Viewer (Bruker, Kontich, Bélgica) para obtenção das imagens em 2D

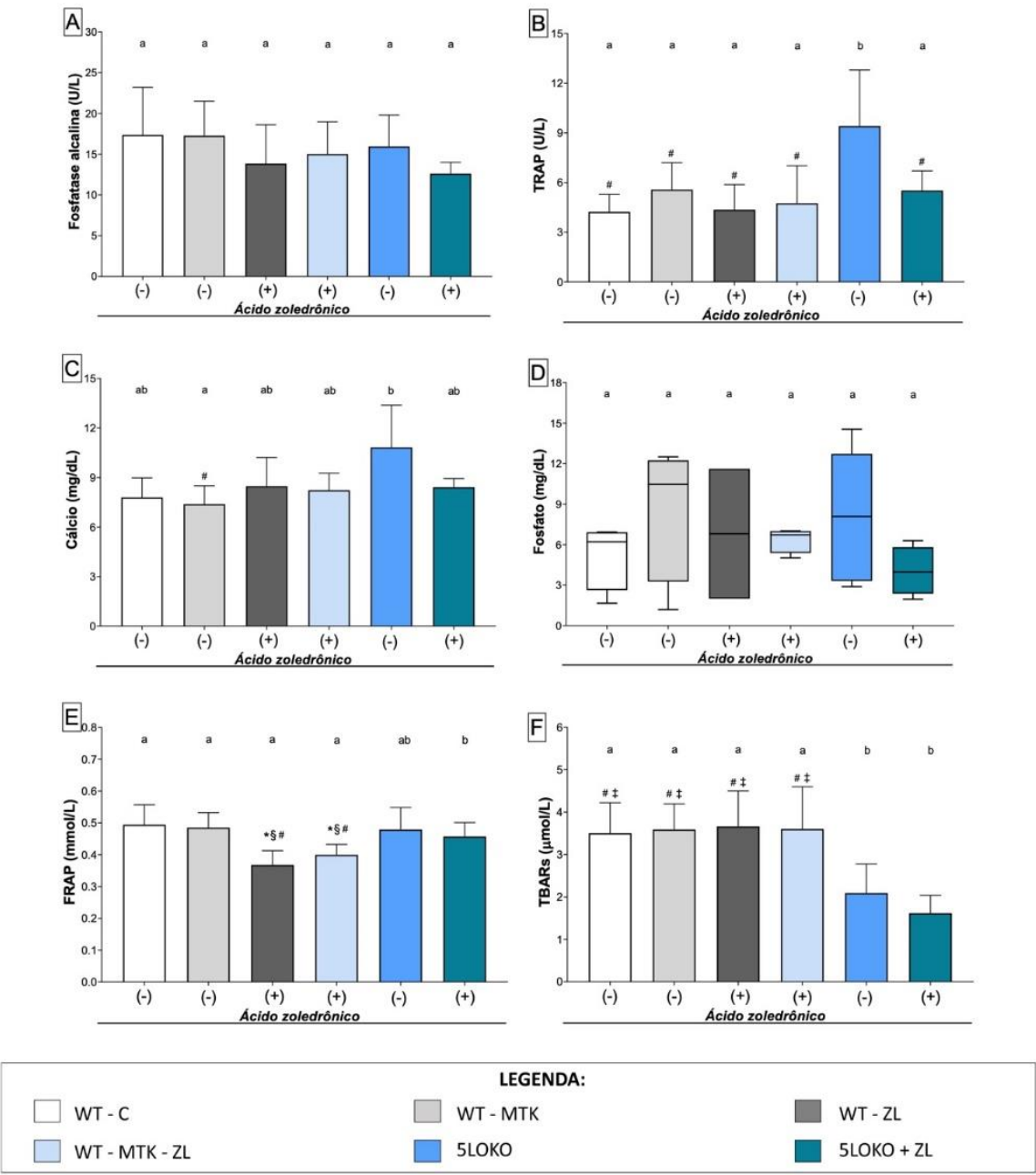


Fonte: Autor, 2024

4.2 Análise dos níveis séricos de FAL, TRACP, cálcio, fosfato, FRAP e TBARs

Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos considerando-se os níveis de FAL. No entanto, observou-se maior nível plasmático de TRACP nos animais 5LOKO ($9,413 \pm 3,381$) em comparação com os demais grupos, WT-C ($4,231 \pm 1,054$), WT-MTK ($5,571 \pm 1,629$), WT-ZL ($4,36 \pm 1,519$), WT-MTK-ZL ($4,75 \pm 2,269$) e 5LOKO-ZL ($5,514 \pm 1,19$). Foram detectados maiores níveis de cálcio no grupo WT-MTK ($7,386 \pm 1,117$) em comparação com 5LOKO ($10,83 \pm 2,553$). Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos considerando os níveis de fosfato. Considerando a capacidade antioxidante dos animais de cada grupo, notou-se maiores níveis plasmáticos de FRAP nos grupos WT-C ($0,4941 \pm 0,0628$), WT-MTK ($0,4852 \pm 0,0471$) e 5LOKO ($0,479 \pm 0,0693$) quando comparados aos WT-ZL ($0,3679 \pm 0,0446$) e WT-MTK-ZL ($0,3999 \pm 0,0325$). No entanto, considerando-se o estresse oxidativo, foram observados maiores níveis de TBARs nos grupos WT-C ($3,504 \pm 0,7174$), WT-MTK ($4,589 \pm 0,6061$), WT-MTK-ZL ($3,601 \pm 0,9954$) em comparação aos grupos 5LOKO ($2,093 \pm 0,6814$) e 5LOKO-ZL ($1,616 \pm 0,4187$) (Figura 3).

Figura 3 - Resultados estatísticos referentes às análises de concentração plasmática de (A) Fosfatase Alcalina, B) TRAP total, C) Cálcio, D) Fosfato, E) FRAP e F) TBARs. O símbolo * indica diferença com WT-C; δ indica diferença com WT-MTK; # indica diferença com 5LOKO; ± indica diferença entre WTs e 5LOKOs; letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos com e sem ZL



4.3 Análise Histopatológica

Após 21 dias dos procedimentos de exodontia, os alvéolos dos animais do grupo WT-C apresentavam-se preenchidos por trabéculas ósseas em remodelação, permeadas por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e eventuais leucócitos mononucleares. O grupo WT-CV mostrou-se semelhante ao WT-C; no entanto, as trabéculas ósseas encontravam-se predominantemente na periferia do alvéolo. Por outro lado, os alvéolos dos animais do grupo WT-MTK mostravam trabéculas ósseas regulares, celularizadas e maduras. Predominantemente, via-se a superfície óssea recoberta por células de revestimento, e eventuais células osteoclásticas com aspecto morfológico regular. Os espaços entre as trabéculas apresentavam-se preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado, com discreto infiltrado inflamatório MN difuso. Por outro lado, os alvéolos dos animais do grupo WT-ZL exibiam trabéculas ósseas grosseiras e delgadas, de aspecto imaturo, revestidas por células osteoblásticas e localizadas predominantemente na periferia dos alvéolos. As trabéculas apresentavam lacunas de osteócitos de contornos irregulares, ora vazias, ora preenchidas por célula que por vezes mostravam núcleos picnóticos. De permeio, observou-se tecido conjuntivo fibroso, ricamente celularizado e vascularizado, com focos de intenso infiltrado inflamatório MN e PMN neutrofílico, especialmente nos terços cervicais. Apesar deste aspecto, era possível observar células osteoclásticas, predominantemente aderidas à superfície óssea e de morfologia regular. Curiosamente, os animais que receberam ambas as medicações, grupo WT-ZL-MTK, tiveram seus alvéolos reparados por trabéculas ósseas regulares recobertas por células de revestimento, porém, predominantemente com presença de trabéculas em remodelação, pela ação de osteoclastos, por vezes pequenos e arredondados. Permeando as trabéculas, notou-se tecido conjuntivo rico em fibroblastos e com focos de infiltrado inflamatório MN e PMN. No entanto, no terço cervical da maioria dos alvéolos era o local onde se observava uma concentração de intenso infiltrado neutrofílico. Os alvéolos dos animais do grupo 5LOKO, por sua vez, exibiam trabéculas ósseas regulares, em processo de remodelação marcada pela presença de osteoclastos, porém, localizadas predominantemente na periferia dos alvéolos. Na região central dos alvéolos, bem como permeando as trabéculas, notou-se tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado, com eventuais focos de discreto infiltrado inflamatório MN e PMN. Quando medicados com ZL, os camundongos

5LOKO do grupo 5LOKO-ZL mostraram quadro semelhante aos WT-ZL, com trabéculas ósseas grosseiras contendo lacunas irregulares ocupadas por osteócitos ora de núcleo grande e volumoso, ora picnótico. Eventuais lacunas vazias também foram visualizadas. As trabéculas apresentavam-se recobertas ora por células de revestimento, ora por osteoblastos, quando em associação com osteoclastos aderidos de morfologia regular. Osteoclastos não aderidos à superfície da matriz óssea, de aspecto arredondado e hipernucleados também foram observados. Permeando as trabéculas e especialmente a região central dos alvéolos, observou-se tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado, com discreto infiltrado inflamatório MN difuso. Eventuais focos de coágulo também foram visualizados. O infiltrado inflamatório mostrava-se mais intenso no terço cervical do alvéolo na região submucosa (Figura 4, Tabela 1).

Figura 4 - Grupo WT-C – alvéolo preenchido por trabéculas ósseas em remodelação (*), ricamente celularizadas em meio a medula constituída por tecido conjuntivo frouxo vascularizado (#). WT-CV – trabéculas em remodelação (*) localizadas na periferia dos alvéolos. WT-MTK – notam-se trabéculas ósseas maduras () revestidas por células de revestimento (setas vermelhas), localizadas predominantemente na periferia dos alvéolos. Nas porções centrais, predomínio de tecido conjuntivo frouxo (#). WT-ZL – trabéculas ósseas irregulares (*), com lacunas ora irregulares, ora vazias (seta azul). WT-MTK-ZL - trabéculas irregulares e osteoclastos arredondados e não aderidos (seta preta). 5LOKO – presença de trabéculas ósseas em maduras. De permeio, observam-se discretos focos de infiltrado inflamatório mononuclear (setas azuis). Grupo 5LOKO-ZL – trabéculas ósseas maduras pobremente celularizadas (**), bem como deposição de matriz óssea primária e osteoclastos não aderidos e arredondados (seta preta) (HE; aumento original 2x e 100x).**

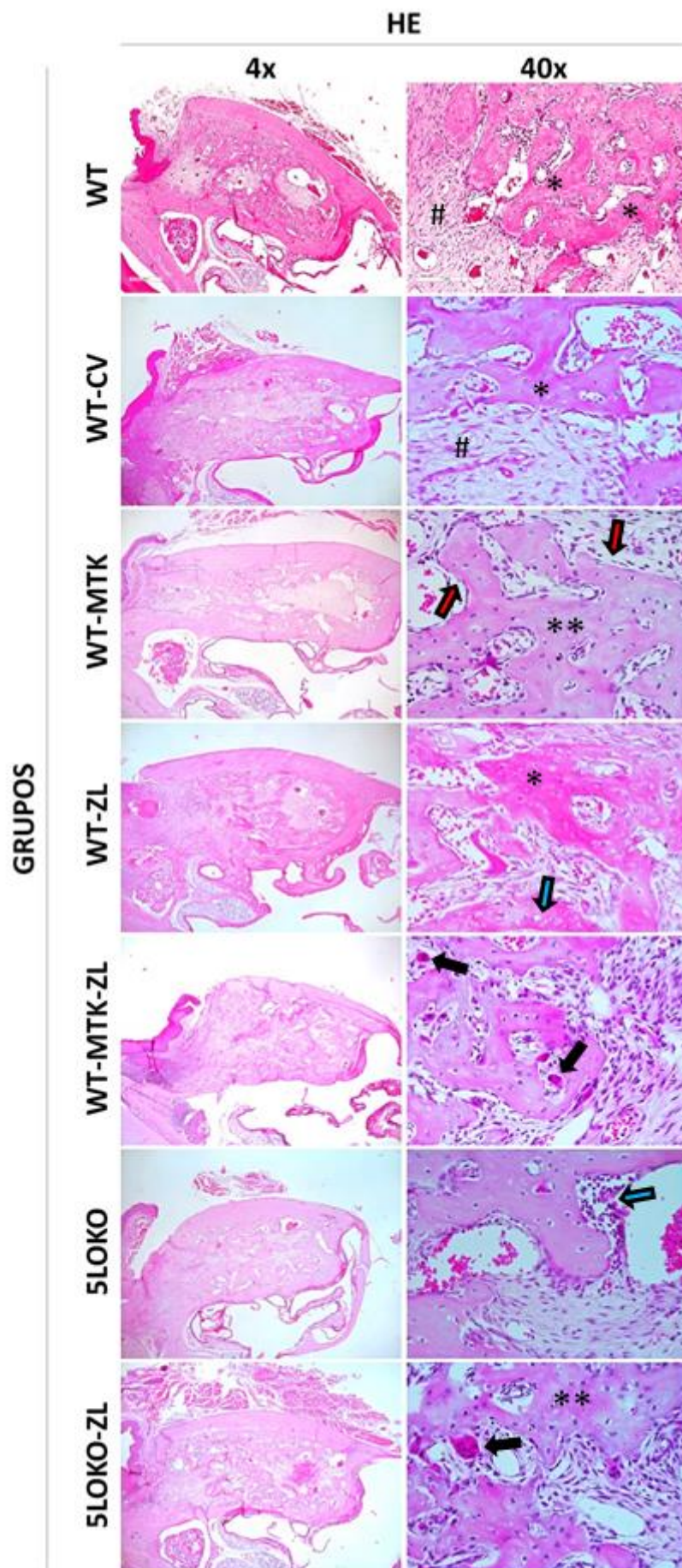


Tabela 1 – Análise histológica comparativa entre os grupos analisados

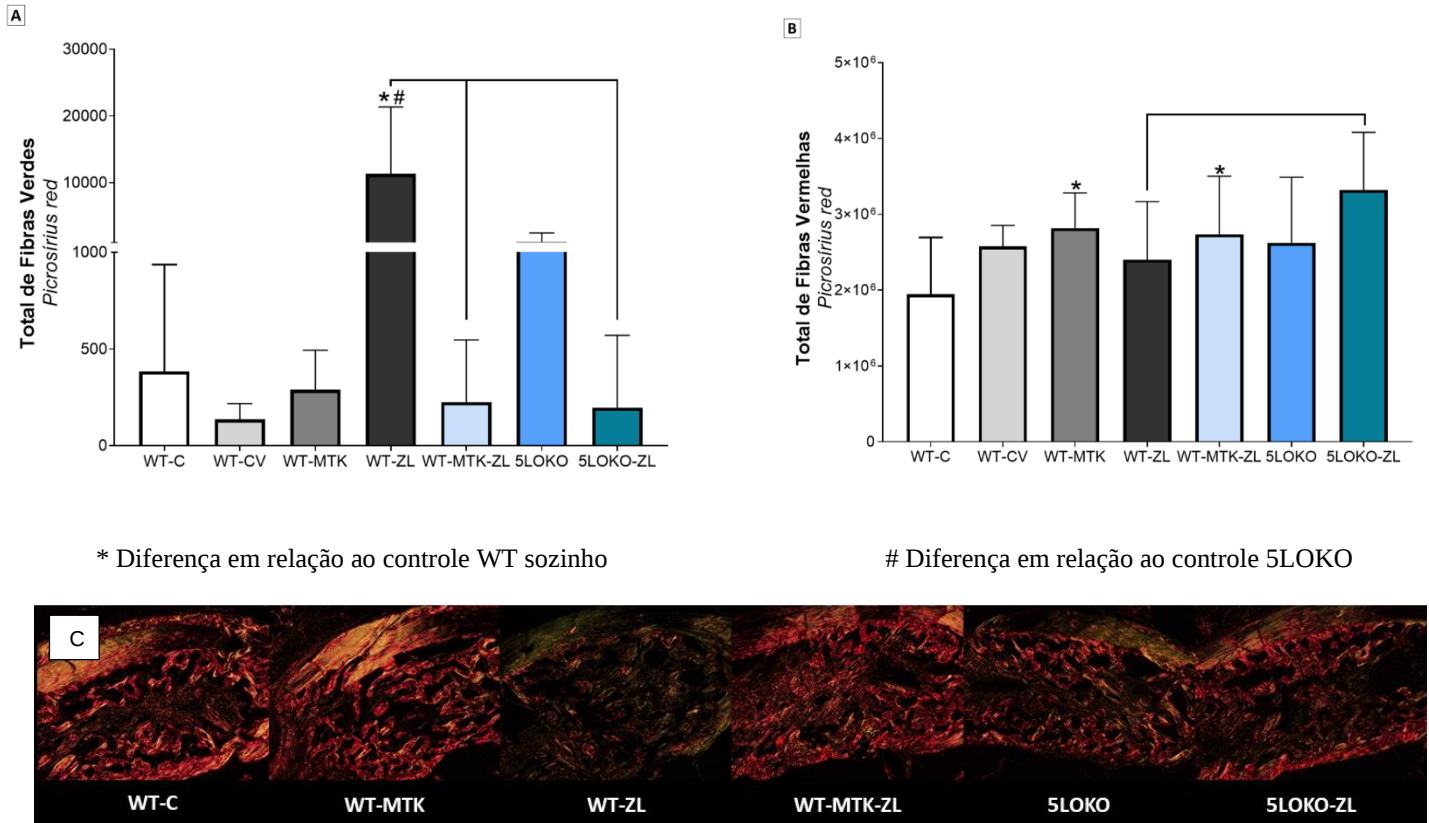
WT-C	WT-MTK	WT-ZL	WT-MTK-ZL	5LOKO	5LOKO-ZL
Trabéculas ósseas em remodelação	Trabéculas ósseas maduras de contornos regulares	Trabéculas ósseas grosseiras e imaturas localizadas na periferia do alvéolo, predominantemente	Trabéculas ósseas ora regulares recobertas por células de revestimento, ora imaturas	Trabéculas ósseas de contornos regulares em remodelação	Trabéculas ósseas maduras, grosseiras, ora recobertas por células de revestimento, ora em remodelação
Tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos	Lacunas preenchidas por osteócitos viáveis	Lacunas de contornos irregulares. Osteócitos viáveis e com núcleos picnóticos	Osteoclastos aderidos com maioria não aderidos de morfologia arredondada e hipernucleados	Focos de atividade osteogênica	Osteoclastos ativos com morfologia regular, eventualmente arredondados e multinucleados
	Remodelação – presença de osteoclastos de morfologia regular	Pouca atividade osteoclástica (morfologia normal e pouco aderidos)	Tecido conjuntivo intensamente celularizado por fibroblastos com infiltrado MN e PMN	Tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado com focos de discreto infiltrado inflamatório mononuclear	Tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso
	Tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos com discreto infiltrado inflamatório MN difuso	Tecido conjuntivo rico em fibras com focos de intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear	Intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear no terço cervical		

Fonte: Autor, 2024

4.4 Análise de Birrefringência

Os dados quantitativos foram inicialmente submetidos à análise de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os parâmetros quantitativos das fibras avaliadas por *Picrosirius red* foram analisados por meio de um teste de Two-way ANOVA, seguido de correção de Bonferroni. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Nos animais WT, a presença de fibras verdes no reparo ósseo alveolar foi significativamente maior no grupo WT-ZL em comparação com o grupo WT-C ($p < 0,001$) e WT-CV ($p < 0,001$). Além disso, entre os grupos que receberam ZL, a presença de fibras verdes também foi significativamente maior no grupo WT-ZL em comparação com o grupo WT-MTK-ZL ($p < 0,001$). Em contraste, nos animais KO, a presença de fibras verdes foi significativamente menor no grupo 5LOKO-ZL em relação ao WT-ZL ($p < 0,001$; Figura 5A). Em relação à presença de fibras vermelhas, foi observado um aumento significativo nos grupos WT-MTK e WT-MTK-ZL em comparação ao WT-C ($p = 0,0123$, $p = 0,0373$; respectivamente). Já na comparação entre os animais que receberam ZL, o grupo 5LOKO-ZL apresentou uma positividade significativamente maior de fibras vermelhas em comparação com o grupo WT-ZL ($p = 0,0064$, Figura 5B). As imagens obtidas por meio de microscópio de polarização podem ser observadas na Figura 5C.

Figura 5 - Resultados estatísticos referentes às análises de birrefringência das fibras colágenas nos espectros verde (A) e vermelho (B). C – Imagem dos cortes sob luz polarizada (Picrosirius-red; aumento original 20x)



Fonte: Autor, 2024

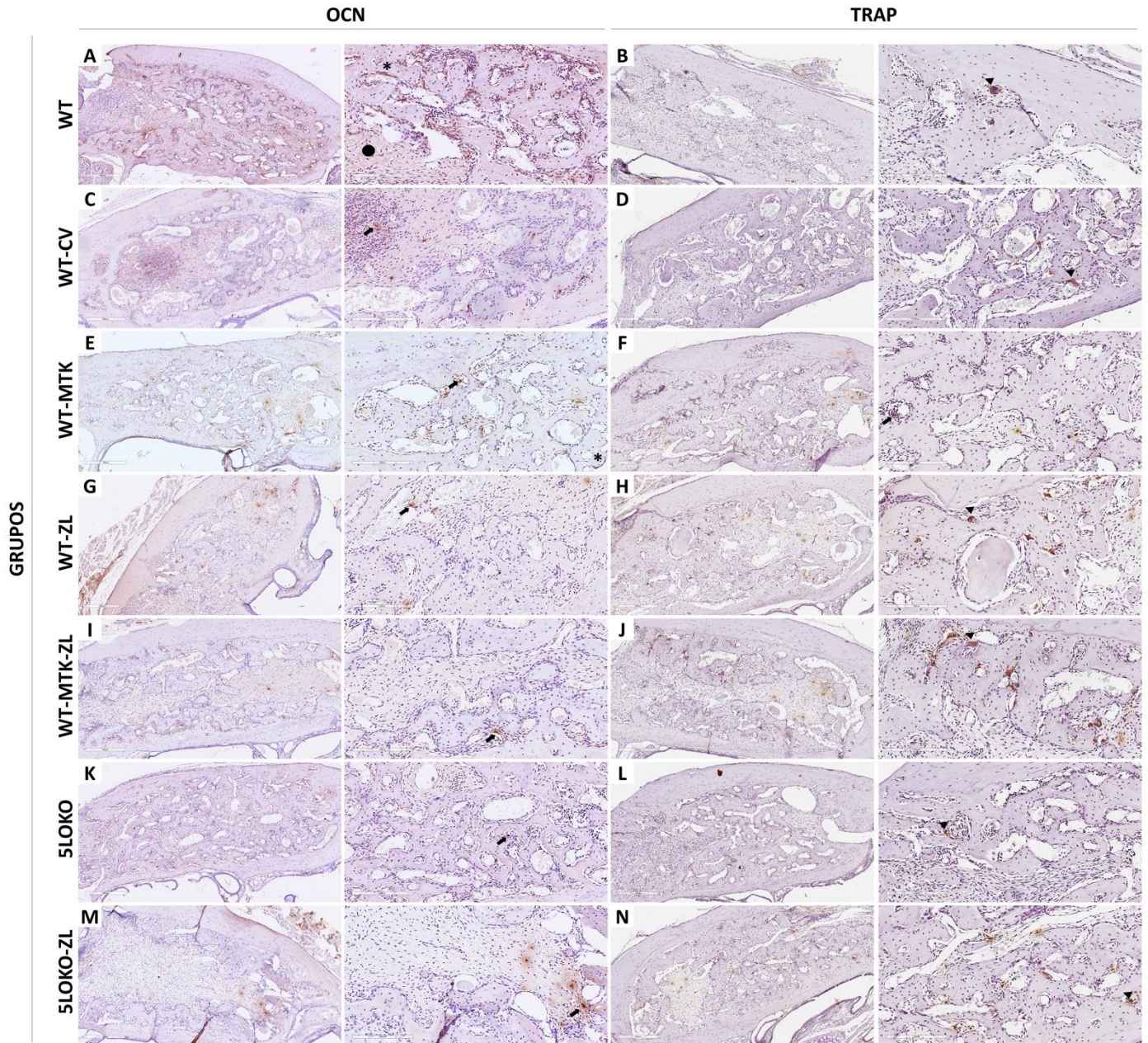
4.5 Análises Imunohistoquímica

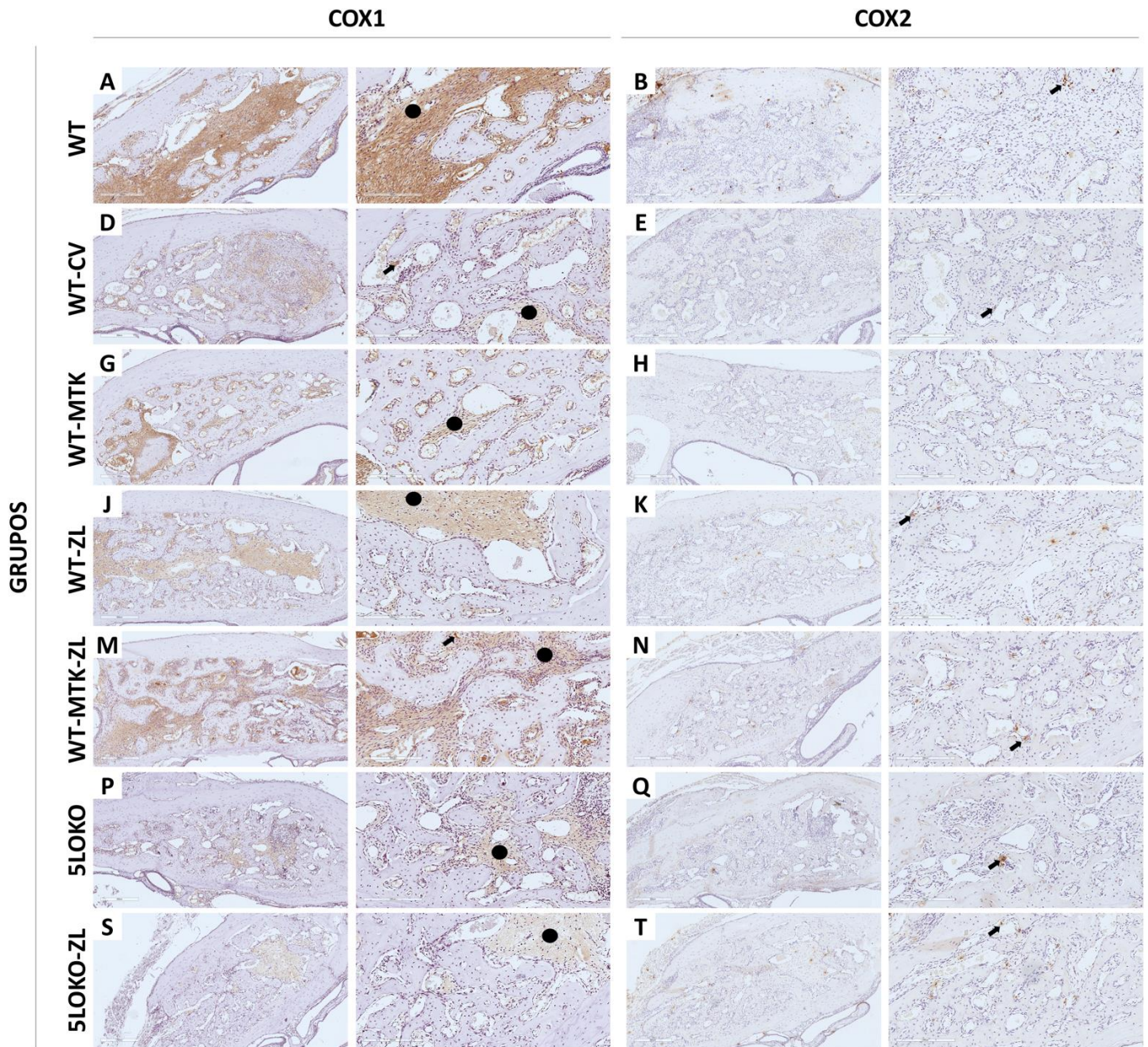
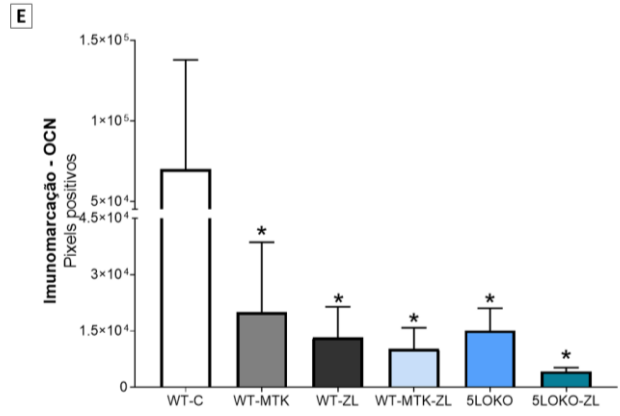
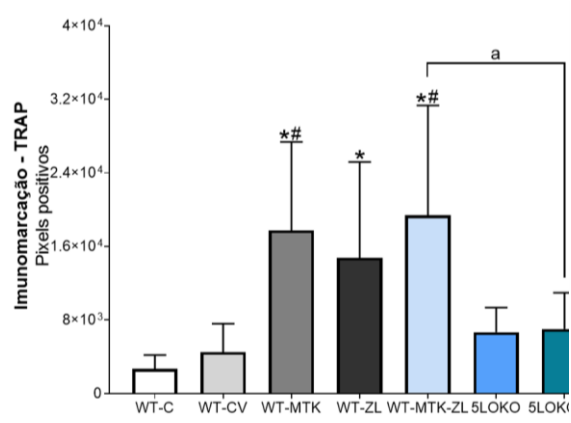
Os dados quantitativos foram inicialmente submetidos à análise de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os parâmetros quantitativos dos marcadores avaliados por imuno-histoquímica foram analisados por meio de um teste de two-way ANOVA, seguido de correção de Bonferroni. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

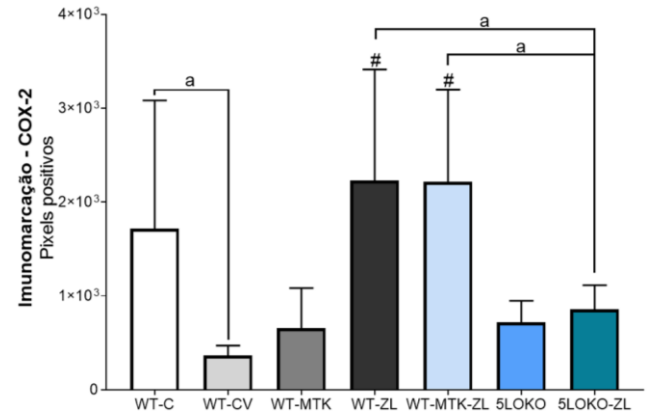
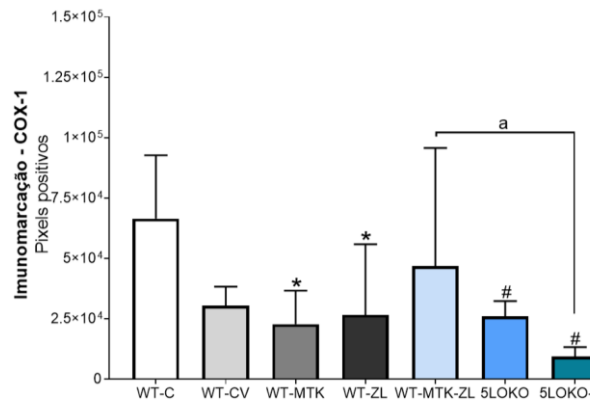
Nos animais WT-C, a presença de **OCN** no reparo ósseo alveolar foi significativamente maior que todos os outros grupos. Já a imunomarcagem para **TRAP** foi significativamente menor nos WT-C quando comparados aos animais WT tratados, WT-MTK, WT-ZL e WT-MTK-ZL. No entanto, na comparação com os animais 5LOKO, estes apresentaram maior presença de TRAP em comparação com os WT-MTK e WT-MTK-ZL. Comparando somente os grupos tratados com ZL, a marcação para

TRAP foi significativamente maior nos animais WT-MTK-ZL em comparação com 5LOKO-ZL. Em se tratando da **COX-1**, observou-se maior presença desta enzima nos animais WT-C quando comparados com seus pares tratados, WT-MTK e WT-ZL. **COX-2** apresentou maior presença no grupo WT-C em comparação com WT-CV e maior também na comparação entre WT-ZL e WT-MTK-ZL e o grupo 5LOKO-ZL.

Figura 6 - Marcações imuno-histoquímicas para OCN, TRAP, COX-1 e COX-2 e seus respectivos resultados estatísticos. O símbolo * indica diferença com WT-C; δ indica diferença com WT-MTK; # indica diferença com 5LOKO; letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos com e sem ZL







5 DISCUSSÃO

Os primeiros relatos da OMAB foram publicados há mais de 20 anos, em 2003 por Marx (Marx, 2003) e ainda, hoje esse intrigante processo patológico mostra pontos obscuros não somente com relação à sua etiopatogenia e de sua manifestação exclusiva nos ossos da mandíbula e maxilas, mas também relacionados à sua prevenção e tratamento, devido às inúmeras variáveis referentes à própria droga utilizada (tipo, posologia, via de administração) e ao indivíduo acometido (sexo biológico, idade, condições sistêmicas), o que torna difícil sua resolução. Deste modo, várias linhas de investigação têm sido desenvolvidas, cada qual com ênfase em alguma destas variáveis. No presente estudo, propôs-se avaliar a influência da inibição de metabólitos da via 5LO por diferentes métodos, por via medicamentosa e alteração genética, sobre o reparo ósseo de camundongos tratados com ZL.

A partir dos resultados obtidos pelo presente trabalho foi possível constatar que a inibição do CisTLR-1 com o uso do MTK na dose de 4mg/Kg, bem como a depleção genética da 5LO, permitiram que o reparo ósseo intra-alveolar ocorresse de modo satisfatório após 21 dias da exodontia do incisivo superior, com formação de trabéculas ósseas regulares e em remodelação, similarmente ao grupo WT-C e corroborando Ribeiro et al. (2023) e Simionato et al. (2021), utilizando o mesmo modelo animal. Sabe-se que outras drogas poderiam ser mais eficientes para alcançar a inibição da 5LO, uma vez que algumas delas tem como seu alvo a própria enzima, como os inibidores Zileuton ou Baicalein (Saul *et al.*, 2018); no entanto, o *index* terapêutico para a inibição dos leucotrienos em doses clínicas é limitado pelos seus efeitos colaterais (Kang *et al.*, 2015). Deste modo, optou-se pelo antagonista do CysTLR1, o MTK, uma vez que o bloqueio deste receptor se comparou ao efeito da inibição da 5LO sobre o NFATc1 (Lee *et al.*, 2012). A escolha da dose utilizada no presente trabalho pode ser conferida na dissertação de Ribeiro (2021) e Ribeiro *et al.* (2023).

O tratamento com o ZL interferiu negativamente no processo de reparo dos animais do grupo WT tratados ou não com MTK e dos animais 5LOKO, resultando em formação de trabéculas ósseas grosseiras e imaturas, com osteócitos com núcleos por vezes picnóticos e presença de intenso infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear. No entanto, não foram observados sequestros ósseos ou áreas de

osso não viável. Sabe-se que as características da osteonecrose dos maxilares em humanos diferem dos modelos animais, especialmente no que se refere aos aspectos clínicos, como o não fechamento da ferida e formação de fístulas (Biguetti et al., 2019). Apesar da ausência de tecido ósseo não viável, a dificuldade de maturação das trabéculas ósseas e os núcleos picnóticos dos osteócitos já denotam alterações significativas que não podem ser consideradas somente um atraso no processo de reparo.

Importante ressaltar que um dos desafios deste estudo foi a determinação da dose do ZL, suficiente para causar tais alterações no reparo ósseo alveolar neste modelo animal. Em estudos anteriores realizados pelo presente grupo de pesquisa a dose de 250 µg/Kg via IP aplicada uma vez por semana, quatro semanas antes do procedimento cirúrgico e continuando até os períodos experimentais se completassem, era o bastante para que a osteonecrose-like se instalasse em camundongos da mesma linhagem. No entanto, destaca-se que os animais utilizados nestes experimentos anteriores eram do sexo biológico feminino, o que possivelmente tenha sido um fator de relevância para esta resposta, independente de os animais serem jovens ou idosas (Biguetti et al., 2019; Mahmoud et al., 2021). Nos modelos de animais machos jovens, observou-se que com esta dosagem não havia alterações significativas no reparo ósseo. Deste modo, a dose foi aumentada para 500 µg/Kg no trabalho de tese de Oliva (2022) uma vez por semana, resultando em uma dose total de 4 mg/Kg por animal, o que também não foi suficiente para se constatar a instalação da OMAB. Deste modo, optou-se por aumentar a dose total entregue (4,25 mg/Kg), porém, fracionada em intervalos menores, a cada três dias ao invés de uma vez por semana.

Resultados diferentes foram obtidos por Hadaya e colaboradores (2024), utilizando camundongos C57BL/6J machos e fêmeas jovens (2 meses de idade) tratados com dose de 200 µg/Kg 2x por semana via IP, onde a variável sexo biológico não interferiu na instalação ou severidade da OMAB. No entanto, neste modelo foi instalada ligadura gengival no segundo molar superior após duas doses da medicação, que permaneceu no local por oito semanas, totalizando 3,6 mg/Kg de droga entregue para cada animal, quando os espécimes foram removidos para análise. A presença da ligadura contribui de maneira importante para o desenvolvimento da doença nos modelos experimentais de OMAB (Silveira et al., 2024), o que dificulta a comparação

entre os dois estudos. Além disso, sabe-se que a linhagem dos animais também interfere nas respostas biológicas. Em estudo realizado por Roseno (2022) comparando o processo de reparo ósseo alveolar entre três linhagens distintas de camundongos, 129Sv/Ev, C57BL/6L e BALB-c, somente machos e jovens, observou-se um aumento significativo de leucócitos totais no período de 7 dias nos animais 129Sv/Ev quando comparados com os C57BL/6L, indicando uma resposta inflamatória inicial mais intensa nos 129Sv/Ev. Além disso, o fenótipo esquelético dos 129Sv/Ev é naturalmente mais robusto que o dos C57BL/6L. Assim, há que se considerar todas estas diferenças quando se analisa trabalhos em modelos com os mesmos animais, porém, de linhagens distintas.

Quando o ZL foi administrado nos animais 5LOKO ou medicados com o MTK (5LOKO-ZL e WT-MTK-ZL, respectivamente), notou-se a persistência de um infiltrado inflamatório difuso em meio a tecido conjuntivo mais denso; porém, as trabéculas ósseas se apresentavam ora maduras, ora em maturação/remodelação. Nestes grupos, os osteoclastos grandes e hiper nucleados, de forma arredondada e não aderidos à superfície óssea eram mais constantes que no grupo WT-ZL. Apesar da presença do infiltrado inflamatório mais evidente nos espaços medulares, a inibição da via 5LO parece ter propiciado uma neoformação óssea mais robusta. Nestas condições, poder-se-ia pensar que tais resultados tenham se dado por uma maior disponibilidade local de COX-2. No entanto, na marcação imuno-histoquímica estes grupos, WT-MTK-ZL e 5LOKO-ZL apresentaram menor quantidade de células imunomarcadas para COX-2 em comparação ao grupo WT-ZL. Cabe ressaltar que o período de análise deste estudo foi de 21 dias após a exodontia, e que os metabólitos do A.A. tem uma ação mais expressiva nas fases iniciais do reparo tecidual. Assim, não se pode descartar esta possibilidade, sendo interessante a análise de períodos iniciais do processo. Ainda, pode-se sugerir que a maior presença de células COX-2+ no grupo WT-ZL neste período de análise, que seria considerada a fase final do reparo ósseo, seja devido à forte interferência do ZL nestes animais.

Apesar dos aspectos histológicos sugerirem trabéculas ósseas mais robustas nos animais com inibição da 5LO, a análise microarquitetural da matriz óssea mineralizada fornecida pelo microCT revelou valores significativamente maiores de BV/TV e Th.Tb nos animais WT tratados ZL (WT-ZL) e com a combinação do MTK e ZL (WT-MTK-ZL), quando comparados com os controles WT e 5LOKO, revelando a

ação do ZL na remodelação óssea. No entanto, o conteúdo mineral por si só não reflete a qualidade do tecido, uma vez que seu arcabouço colagenoso se revela de extrema importância, de modo que mostra a capacidade de remodelação e resiliência óssea (Fonseca et al., 2014). Assim, pela análise de birrefringência dos alvéolos consegue-se analisar a qualidade da matriz colagenosa do tecido, uma vez que a organização e o alinhamento das fibras colágenas apresentam espectros diferentes variando de verde a vermelho, sendo que o verde revela fibras menores e não alinhadas, e à medida em que o espectro se torna laranja/vermelho, revela fibras mais alinhadas e organizadas (Lattouf et al., 2014), o que conferem maior resistência ao tecido pelo alinhamento com o conteúdo mineral. Obteve-se como resultados desta análise o aumento significativo de fibras do espectro verde no grupo WT-ZL em comparação com seu controle (WT-C) e com WT-CV, e em comparação com WT-MTK-ZL. Também o grupo 5LOKO-ZL apresentou aumento significativo de fibras verdes quando comparado com o WT-ZL. De modo interessante, observou-se aumento significativo de fibras do espectro vermelho nos grupos WT-MTK e WT-ZL em comparação com o WT-C e aumento significativo no 5LOKO-ZL em comparação ao WT-ZL, denotando que a inibição da 5LO pela depleção genética, apesar da ação do ZL conseguiu manter um padrão de remodelação levando a um equilíbrio dos dois espectros de fibras, o que não foi observado quando se utilizou o MTK nos animais WT tratados com ZL. Pode-se inferir, que os animais 5LOKO, por já nascerem e se desenvolverem nestas condições, consigam, em uma situação de reparo e não de integridade óssea, utilizar outras vias para o desempenho adequado dos osteoclastos.

Aqui fica evidente a necessidade de se combinar os aspectos histológicos e imaginológicos, pois consegue-se observar a qualidade do tecido ósseo pelo seu padrão de celularidade, morfologia das trabéculas e lacunas, tecido medular, sua microarquitetura e conteúdo colagenoso.

Apesar do já conhecido fenótipo esquelético dos animais 5LOKO mais robustos que o WT (Bonewald *et al.*, 1997), de modo interessante os níveis de TRACP totais destes animais mostrou-se significativamente mais elevado que os demais, e com maiores níveis de cálcio quando comparado com os animais WT tratados com MTK (WT-MTK). Estes resultados revelam as diferenças entre o metabolismo ósseo total e as condições locais de um sítio de reparo ósseo, uma vez que a imunomarcagem para TRAP mostrou-se oposta, estando significativamente mais presente nos animais WT-

MTK e WT-MTK-ZL que os 5LOKO. Sugere-se que a inibição da atividade reabsortiva dos osteoclastos pelo ZL seja um atrativo para o recrutamento de mais células para executar esta função (Dalbeth *et al.*, 2013), uma vez que os animais WT tratados com ZL apresentaram maior marcação de TRAP que seu comparativo controle (WT-C).

A ausência de informações a respeito do estresse oxidativo neste modelo animal levou à opção pelas análises da capacidade antioxidante pela FRAP e oxidante pelo TBARs. Os animais WT tratados com ZL, associados ou não com o MTK apresentaram menores níveis de FRAP que seus pares não tratados com ZL, mesmo na comparação com os 5LOKO. De modo contrário, observou-se aumento dos níveis de TBARs comparando todos os grupos WT com 5LOKO e 5LOKO-ZL. Possivelmente isto confirme os efeitos deletérios da 5LO no metabolismo ósseo dos animais, como observado em Mahmoud *et al.* (2021), bem como os efeitos do ZL na modulação inflamatória sistêmica do indivíduo (Zhang *et al.*, 2013).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e considerando-se o modelo experimental, concluiu-se que, de modo geral, a inibição do CisLTR-1 pelo uso do MTK e a depleção genética da 5-LO reduziram os efeitos negativos da ação do ZL, em cujos animais esta droga prejudicou o processo de reparo ósseo pós-exodontia, bem como a qualidade do tecido ósseo neoformado.

REFERÊNCIAS

- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996 Jul 15;239(1):70-6. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Bigueti CC, Cavalla F, Silveira EM, Fonseca AC, Vieira AE, Tabanez AP, Rodrigues DC, Trombone APF, Garlet GP. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *J Appl Oral Sci.* 2018a Jun;26:e20170601. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0601.
- Bigueti CC, Vieira AE, Cavalla F, Fonseca AC, Colavite PM, Silva RM, Trombone APF, Garlet GP. CCR2 contributes to F4/80+ cells migration along intramembranous bone healing in maxilla, but its deficiency does not critically affect the healing outcome. *Front Immunol.* 2018b Aug;9:1804. doi: 10.3389/fimmu.2018.01804.
- Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, Dallas MR, Mundy GR, Boyce BF. Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. *Adv Exp Med Biol.* 1997;433:299-302. doi: 10.1007/978-1-4899-1810-9_63.
- Bousquet J, Demoly P, Humbert M. Montelukast in guidelines and beyond. *Adv Ther.* 2009;26(6):575-87. doi: 10.1007/s12325-009-0038-1.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.
- Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol.* 2012 Jan 31;8(3):133-43. doi: 10.1038/nrrheum.2012.1.
- Dalbeth N, Pool B, Stewart A, Horne A, House ME, Cornish J, Reid IR. No reduction in circulating preosteoclasts 18 months after treatment with zoledronate: analysis from a randomized placebo-controlled trial. *Calcif Tissue Int.* 2013 Jan;92(1):1-5. doi: 10.1007/s00223-012-9654-x.

Endo Y, Kumamoto H, Nakamura M, Sugawara S, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Takahashi T. Underlying mechanisms and therapeutic strategies for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). *Biol Pharm Bull.* 2017;40(6):739-50. doi: 10.1248/bpb.b16-01020.

Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med.* 2014 Jan;44(1):37-53. doi: 10.1007/s40279-013-0100-7.

Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, Bonewald LF. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1996 Nov;11(11):1619-27. doi: 10.1002/jbmr.5650111105.

Hadaya D, Soundia A, Bezouglaia O, Pirih F, Aghaloo TL, Tetradis S. The Incidence and Severity of Medication Related Osteonecrosis of the Jaws is Similar in Male and Female Mice. *J Oral Maxillofac Surg.* 2024 Sep;82(9):1139-1146. doi: 10.1016/j.joms.2024.06.025.

Kang JH, Ting Z, Moon MR, Sim JS, Lee JM, Doh KE, Hong S, Cui M, Choi S, Chang HW, Park Choo HY, Yim M. 5-Lipoxygenase inhibitors suppress RANKL-induced osteoclast formation via NFATc1 expression. *Bioorg Med Chem.* 2015 Nov;23(21):7069-78. doi: 10.1016/j.bmc.2015.09.025.

Khan AA, Morrison A, Kendler DL, Rizzoli R, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, Reid IR, Ruggiero SL, Taguchi A, Tetradis S, Watts NB, Brandi ML, Peters E, Guise T, Eastell R, Cheung AM, Morin SN, Masri B, Cooper C, Morgan SL, Obermayer-Pietsch B, Langdahl BL, Dabagh RA, Davison KS, Sándor GK, Josse RG, Bhandari M, El Rabbany M, Pierroz DD, Sulimani R, Saunders DP, Brown JP, Compston J; International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management From the International Task Force on ONJ. *J Clin Densitom.* 2017 Jan-Mar;20(1):8-24. doi: 10.1016/j.jocd.2016.09.005.

Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, Le AD, Shi S. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1668-79. doi: 10.1002/jbmr.37.

Lange U, Teichmann J, Schett G, Neumann E, Müller-Ladner U. Osteoimmunologie: Wie die Entzündung den Knochenstoffwechsel beeinflusst. *Dtsch Med Wochenschr.* 2013 Sep;138(37):1845-9. doi: 10.1055/s-0033-1349486.

Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, Changotade S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem.* 2014 Oct;62(10):751-8. doi: 10.1369/0022155414545787.

Lee JM, Park H, Noh AL, Kang JH, Chen L, Zheng T, Lee J, Ji SY, Jang CY, Shin CS, Ha H, Lee ZH, Park HY, Lee DS, Yim M. 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Immunol.* 2012 Dec;189(11):5284-92. doi: 10.4049/jimmunol.1003738.

Li J, Tan J, Martino MM, Lui KO. Regulatory T-cells: potential regulator of tissue repair and regeneration. *Front Immunol.* 2018 Mar;9:585. doi: 10.3389/fimmu.2018.00585.

Lin HN, O'Connor JP. Immunohistochemical localization of key arachidonic acid metabolism enzymes during fracture healing in mice. *PLoS One.* 2014 Feb;9(2):e88423. doi: 10.1371/journal.pone.0088423.

Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* 2016 May;86:119-30. doi: 10.1016/j.bone.2016.02.020.

Mahmoud RH, Bigueti CC, Simionato GB, Custódio IC, Silva RBP, Duarte MAH, Faverani LP, Ervolino E, Fakhouri WD, Matsumoto MA. Alveolar socket healing in 5-lipoxygenase knockout aged female mice treated or not with high dose of zoledronic acid. *Sci Rep.* 2021 Oct;11(1):19535. doi: 10.1038/s41598-021-98713-2.

Manigrasso MB, O'Connor JP. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. *Acta Orthop.* 2010 Dec;81(6):748-55. doi: 10.3109/17453674.2010.533931.

Martel-Pelletier J, Mineau F, Fahmi H, Laufer S, Reboul P, Boileau C, Lavigne M, Pelletier JP. Regulation of the expression of 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase and the synthesis of leukotriene B(4) in osteoarthritic chondrocytes: role of transforming growth factor beta and eicosanoids. *Arthritis Rheum.* 2004 Dec;50(12):3925-33. doi: 10.1002/art.20632.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Sep;61(9):1115-7. doi: 10.1016/s0278-2391(03)00720-1.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1567-75. doi: 10.1016/j.joms.2005.07.010.

Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Mar;24(2):195-201. doi: 10.1007/s10103-008-0544-4.

Matsumoto MA, Oliveira A, Ribeiro Junior PD, Nary Filho H, Ribeiro DA. Short-term administration of non-selective and selective COX-2 NSAIDs do not interfere with bone repair in rats. *J Mol Histol.* 2008 Aug;39(4):381-7. doi: 10.1007/s10735-008-9176-z.

Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Mar;65(3):415-23. doi: 10.1016/j.joms.2006.10.061.

Moreschi E, Bigueti CC, Comparim E, Holgado LA, Ribeiro-Junior PD, Nary-Filho H, Matsumoto MA. Cyclooxygenase-2 inhibition does not impair block bone grafts healing in rabbit model. *J Mol Histol.* 2013 Dec;44(6):723-31. doi: 10.1007/s10735-013-9519-2.

Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 Jun;14(2):179-86. doi: 10.1089/ten.teb.2008.0038.

Mouraret S, Hunter DJ, Bardet C, Brunski JB, Bouchard P, Helms JA. A pre-clinical murine model of oral implant osseointegration. *Bone.* 2014 Jan;58:177-84. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.021.

O'Connor JP, Manigrasso MB, Kim BD, Subramanian S. Fracture healing and lipid mediators. *Bonekey Rep.* 2014 Apr;3:517. doi: 10.1038/bonekey.2014.12.

Oliva AH. Processo de reparo alveolar frente à administração de bifosfonato nitrogenado: avaliação comparativa em camundongos 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

Patntirapong S, Poolgesorn M. Alteration of macrophage viability, differentiation, and function by bisphosphonates. *Oral Dis.* 2018 Oct;24(7):1294-302. doi: 10.1111/odi.12908.

Picke AK, Campbell GM, Blüher M, Krügel U, Schmidt FN, Tsourdi E, Winzer M, Rauner M, Vukicevic V, Busse B, Salbach-Hirsch J, Tuckermann JP, Simon JC, Anderegg U, Hofbauer LC, Saalbach A. Thy-1 (CD90) promotes bone formation and protects against obesity. *Sci Transl Med.* 2018 Aug;10(453):eaao6806. doi: 10.1126/scitranslmed.aao6806.

Ribeiro KHC, Silva RBP, Roseno ACB, Barreto AJM, Bacelar ACZ, Ervolino E, Duarte MAH, Fakhouri WD, Chaves-Neto AH, Biguetti CC, Matsumoto MA. Dose-response effect of Montelukast on post-extraction dental socket repair and skeletal phenotype of mice. *Odontology.* 2023 Oct;111(4):891-903. doi: 10.1007/s10266-023-00800-5.

Ribeiro KHC. Efeito tempo-dose-resposta *do* montelucaste no processo de reparo alveolar em camundongos 129Sv/Ev [dissertação].__Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2021.

Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 2011 Jul;49(1):34-41. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008.

Rogers TL, Holen I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med.* 2011 Oct;9:177. doi: 10.1186/1479-5876-9-177.

ROSENO, A. C. B. Análise comparativa do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos machos das linhagens 129Sv/Ev, C57Bl/6J e BALB/c. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis

of the jaw: 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Oct;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031.

Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011 Jul;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.

Sabatino R, Antonelli A, Battistelli S, Schwendener R, Magnani M, Rossi L. Macrophage depletion by free bisphosphonates and zoledronate-loaded red blood cells. *PLoS One.* 2014 Jun;9(6):e101260. doi: 10.1371/journal.pone.0101260.

Sato M, Grasser W. Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J Bone Miner Res.* 1990 Jan;5(1):31-40. doi: 10.1002/jbmr.5650050107.

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA. Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest.* 1991 Dec;88(6):2095-105. doi: 10.1172/JCI115539.

Saul D, Ninkovic M, Komrakova M, Wolff L, Simka P, Gasimov T, Menger B, Hoffmann DB, Rohde V, Sehmisch S. Effect of zileuton on osteoporotic bone and its healing, expression of bone, and brain genes in rats. *J Appl Physiol.* 2018 Jan;124(1):118-30. doi: 10.1152/japplphysiol.01126.2016.

Silveira GRC, Ganzaroli VF, Toro LF, Lopes-Pereira E, Costa LLD, Mello-Neto JM, Buchaim RL, Garcia VG, Theodoro LH, Sforcin JM, Marcato PD, Ervolino E. Effectiveness of Local Use of Green Propolis-Loaded Lipid Nanoparticles as Adjuvant Therapy to Scaling and Root Planing in the Management of Periodontitis in Rats Treated with Zoledronate. *Int J Mol Sci.* 2024 Nov 20;25(22):12443. doi: 10.3390/ijms252212443.

Simionato GB, Silva ACR, Oliva AH, Furquim EMA, Couto MCR, Shinohara AL, Bigueti CC, Matsumoto MA. Lack of 5-lipoxygenase in intramembranous and endochondral 129Sv mice skeleton and intramembranous healing. *Arch Oral Biol.* 2021 Nov;131:105266. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105266.

Simon AM, O'Connor JP. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Mar;89(3):500-11. doi: 10.2106/JBJS.F.00127.

Sud'ina GF, Pushkareva MA, Shephard P, Klein T. Cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) selectivity of COX inhibitors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008 Feb;78(2):99-108. doi: 10.1016/j.plefa.2007.12.006.

Taniguchi N, Osaki M, Onuma K, Ishikawa M, Ryoke K, Kodani I, Okada F. Bisphosphonate-induced reactive oxygen species inhibit proliferation and migration of oral fibroblasts: a pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Periodontol*. 2020 Jul;91(7):947-55. doi: 10.1002/JPER.19-0385.

Thalji G, Cooper LF. Molecular assessment of osseointegration in vitro: a review of current literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Mar-Apr;29(2):e171-99.

Thalji GN, Nares S, Cooper LF. Early molecular assessment of osseointegration in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Nov;25(11):1273-85. doi: 10.1111/clr.12266.

Thimmappa B, Girod SC. Principles of implant-based reconstruction and rehabilitation of craniofacial defects. *Craniofacial Trauma Reconstr*. 2010 Mar;3(1):33-40. doi: 10.1055/s-0030-1249372.

Wang H, Ji Q, Liao C, Tian L. A systematic review and meta-analysis of loratadine combined with montelukast for the treatment of allergic rhinitis. *Front Pharmacol*. 2023 Oct 17;14:1287320. doi: 10.3389/fphar.2023.1287320.

Wei J, Chen S, Huang C, Guo W, Yang S, Feng B, Chu J. Antagonism of cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) by montelukast regulates differentiation of MC3T3-E1 cells under overloaded mechanical environment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):995-1001. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.051.

Wehrhan F, Moebius P, Amann K, Ries J, Preidl R, Neukam FW, Weber M. Macrophage and osteoclast polarization in bisphosphonate associated necrosis and osteoradionecrosis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017 Jun;45(6):944-53. doi: 10.1016/j.jcms.2017.02.023.

Yarom N, Yahalom R, Shoshani Y, Hamed W, Regev E, Elad S. Osteonecrosis of the jaw induced by orally administered bisphosphonates: incidence, clinical features, predisposing factors and treatment outcome. *Osteoporos Int*. 2007 Oct;18(10):1363-70. doi: 10.1007/s00198-007-0384-2.

Zhang Q, Atsuta I, Liu S, Chen C, Shi S, Shi S, Le AD. IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. Clin Cancer Res. 2013 Jun;19(12):3176-88. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0042.

Zheng C, Shi X. Cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) regulates osteoclast differentiation and bone resorption. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(sup3):S64-S70. doi: 10.1080/21691401.2018.1489264.

ANEXO 1

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Influência dos bifosfonatos nitrogenados e montelukaste sobre fatores inflamatórios e endócrinos em camundongos 129s/Ev WT e 5LOKO"**, Processo FOA nº 0599-2021, sob responsabilidade de Mariza Akemi Matsumoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Setembro de 2021.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 30 de Setembro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Outubro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of nitrogen containing bisphosphonates and montelukast on inflammatory and endocrine parameters in 129s/Ev WT and 5LOKO mice"**, Protocol FOA nº 0599-2023, under the supervision of Mariza Akemi Matsumoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 30, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 30, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator