



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

GUSTAVO BARONI SIMIONATO

**Padrão inflamatório morfológico e imuno-histoquímico do
reparo alveolar em camundongos com fenótipo esquelético
osteopetrótico tratados com bifosfonato nitrogenado**

Araçatuba - SP
2022

GUSTAVO BARONI SIMIONATO

**Padrão inflamatório morfológico e imuno-histoquímico do
reparo alveolar em camundongos com fenótipo esquelético
osteopetrótico tratados com bifosfonato nitrogenado**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba, da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Mariza Akemi
Matsumoto

Coorientadores: Prof^a. Ass. Claudia
Cristina Bigueti

**Araçatuba - SP
2022**

Aos meus pais, Marcio Aparecido Simionato e Zilda Baroni Simionato, com amor e gratidão dedico este trabalho e todos os méritos alcançados até aqui. Agradeço todas as oportunidades que sempre me deram para alcançar meus sonhos, toda compreensão nos dias difíceis e toda dedicação e esforço diário para fazer possível esse momento.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida por me sustentarem e fortalecerem todos os dias da minha vida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

À minha orientadora, Prof^a Mariza Akemi Matsumoto, por ter me acolhido desde o meu primeiro ano na faculdade, por ter sido meu grande espelho acadêmico e profissional durante esses anos. A senhora é exemplo de profissionalismo, de gentileza, de educação e é um ser humano incrível. Pude ver como se faz ciência de excelência e alto nível sem deixar a simplicidade da vida de lado. Obrigado por toda paciência, por todos ensinamentos passados e por todas as oportunidades. Sou muito privilegiado e honrado de poder ter a senhora como minha orientadora e uma grande amiga.

À minha coorientadora, Prof^a Claudia Cristina Biguetti, por todo exemplo de competência e profissionalismo. Aprendi muito o significado de ser cientista e fazer ciência com você. Obrigado por ter feito parte da minha formação acadêmica, foi um privilégio. Obrigado por todos ensinamentos e por sempre se fazer presente nos ajudando incontáveis vezes mesmo de longe.

Ao meu coorientador, Prof Edilson Ervolino, que sempre se fez presente nos ajudando incontáveis vezes e sempre somando conhecimento para o desenvolvimento do trabalho. Obrigado pela imensa contribuição e ensinamentos passados durante esses anos. Um exemplo de professor e pesquisador pelo qual tenho grande admiração.

Ao Prof André Bertoz, por ter sido extremamente receptivo comigo, por todas as inúmeras oportunidades e ensinamentos passados dentro da área da Ortodontia. Sinceridade e um coração gigante são visíveis em você. Obrigado por permitir que eu adentrasse ao mundo da ortodontia com sua orientação, foi um privilégio e tenho certeza que ganhei um amigo.

Aos meus irmãos, Vitor Baroni Simionato e Augusto Baroni Simionato, pela amizade e companheirismo e por sempre se fazerem presentes na minha vida e jornada acadêmica.

À minha namorada, Victória Assumpção de Oliveira, por ser minha companheira de vida, por todo apoio durante esses anos e por sempre se fazer presente independentemente da situação.

Ao meu primo, irmão e padrinho Rogério Botelho Simionato, por toda ajuda e apoio durante meu período de estudos e por se fazer sempre presente. Tenho grande admiração por você, pela pessoa e profissional.

Aos meus padrinhos de batismo, Marcos Vinicio Simionato e Paula Furquim Carrara Simionato, por todo apoio e por se fazerem presentes durante meu período de estudos, desde a época de cursinho até a conclusão da minha graduação.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Elisa Furquim, Ana Claudia Rodrigues, Ana Carolina Zucon, Nataira Momesso, André Oliva, Raquel Parra, Kim Henderson, Vinicius Rosa, Danilo Masocatto, Ramez Mahamoud, Samyra Tazaki, Felipe Pederro, Ana Carolyna Becher, Ana Julia Moreno e Juliana Meira, pela amizade construída e pelo trabalho em equipe desde o cuidado com os animais até o desenvolvimento dos projetos de pesquisa. Sozinhos não chegamos a lugar nenhum, vocês foram essenciais para o alcance de todas essas etapas.

Ao Departamento de Ciências Básicas, através do Prof Cláudio Casatti, Prof^a Alaíde Gonçalves, Prof^a Roberta Okamoto, Prof José Américo, Prof Paulo Roberto Botacin pela convivência e aprendizado.

À Agência de Fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa através do Processo nº 2018/14488-9.

“Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor... O melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

SIMIONATO, G. B. Padrão inflamatório morfológico e imuno-histoquímico do reparo alveolar em camundongos com fenótipo esquelético osteopetrótico tratados com bifosfonato nitrogenado. 2022.

RESUMO

A ação dos bifosfonatos nitrogenados (BFs) consiste em inibir a reabsorção do tecido ósseo por meio de sua capacidade de interferir na organização e função das células osteoclásticas, tornando-o altamente mineralizado e pouco reativo, favorecendo a instalação da osteonecrose dos maxilares quando associado à procedimentos invasivos na cavidade bucal. No entanto, estudos tem demonstrado que além de sua interferência direta sobre a dinâmica óssea o sistema imunológico também pode ser acometido pela sua administração crônica, não sendo o fator qualidade óssea o único a ser considerado. O presente estudo teve como objetivo analisar o padrão inflamatório microscópico morfológico do alvéolo e mucosa sobrejacente e imuno-histoquímico durante o processo de reparo dos alvéolos dentários de incisivos superiores recém-extraídos de camundongos 129/Sv geneticamente modificados (knockout - KO) para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO) 5-LOKO e selvagens (WT), com e sem administração de BF. Foram confeccionados cortes histológicos de todos os grupos nos períodos de 3, 7, 14 e 30 dias pós-operatórios para análise histopatológica e histomorfométrica dos alvéolos em reparação corados com H.E., bem como para marcação imuno-histoquímica para COX-2 e 5-LO. Na análise histopatológica, os alvéolos do grupo WT C repararam sem intercorrências. No entanto, o grupo KO C apresentou presença de trabéculas ósseas regulares já aos 7d. A presença do ZL alterou de modo importante o reparo dos animais WT e KO, resultando em trabéculas ósseas irregulares com áreas não viáveis, e persistente infiltrado inflamatório especialmente no grupo KO-ZL. Nestes animais, a mucosa sobrejacente mostrou hiperortoqueratinização da camada superficial do epitélio e áreas de acantose. Além disso, a administração do ZL ocasionou uma redução significativa de matriz óssea nos animais KO ao final do reparo, com aumento de leucócitos mononucleares no grupo KO-ZL 30d quando comparado ao grupo WT-ZL 30d, além de uma diminuição de leucócitos polimorfonucleares no grupo WT-ZL 30d quando confrontados aos grupos KO C e KO-ZL 30d. O grupo WT C apresentou imunomarcação para 5-LO aos 7d e 14d, enquanto o grupo WT-ZL apenas aos 7d. Níveis de COX-2 se mantiveram

constantes durante os períodos nos grupos analisados. Os resultados obtidos nos permitem concluir que o tratamento com ZL influenciou de maneira mais importante os animais 5-LOKO, alterando o reparo da mucosa bucal sobrejacente ao alvéolo e influenciando negativamente a neoformação óssea no curso do reparo alveolar. No reparo ósseo, o medicamento parece estimular a produção da enzima 5-LO nos períodos iniciais, observados nos animais WT C, sem no entanto, alterar níveis de COX-2.

Palavras-chave: 5-leucotrieno. Bifosfonatos. Camundongos. Osteonecrose dos maxilares.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	LEGENDA	PÁGINA
1	Aspectos histopatológicos dos alvéolos pós-exodontia em reparação dos grupos WT C, WT-ZL, KO C, KO-ZL aos 3, 7, 14 e 30 dias (HE; aumento original 100x)	25
2	Aspecto histopatológico das mucosas em reparação, aos 3, 7, 14 e 30 dias, dos grupos WT C, WT-ZL, KO C, KO-ZL (HE; aumento original 20x)	27
3	Resultados estatísticos referentes às análises histomorfométricas dos alvéolos. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$	30
4	Representação gráfica dos resultados obtidos pela análise histomorfométrica dos grupos MN e PMN. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos	33
5	Representação histopatológica de osteócitos e osteoblastos marcados positivamente para COX-2, bem como leucócitos (aumento original 100x)	36
6	Gráfico representativo da marcação de COX-2 entre os grupos e períodos. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (*). Resultados obtidos foram submetidos aos testes de Kruskal Wallis seguido de Dunn considerando o nível de significância de 5%	37
7	Setas indicam células marcadas positivamente para 5-LO (aumento original 100x)	38

LISTA DE TABELAS

TABELA	LEGENDA	PÁGINA
1	Distribuição dos animais pertencentes aos grupos WT C, WT-ZL, KO C, KO-ZL	18
2	Médias e desvio-padrão obtidos a partir da análise histomorfométrica. Foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Kruskal Wallis seguido de Dunn, considerando nível de significância de 5%	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Gerais	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Aspectos Éticos	17
3.2 Modelo Experimental	17
3.3 Delineamento Experimental	17
3.4 Tratamento Farmacológico com ZL	18
3.5 Procedimento Cirúrgico	18
3.6 Eutanásia dos Animais e Coleta dos Espécimes	19
3.7 Procedimentos Histotécnicos	19
3.8 Análise Histopatológica	20
3.9 Análise Imuno-histoquímica	20
3.10 Análise Histomorfométrica	20
3.11 Análises Estatísticas	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Descrição Morfológica Microscópica Qualitativa do Alvéolo	22
4.2 Descrição Morfológica Microscópica Qualitativa da Mucosa	25
4.3 Análise Morfológica Microscópica Quantitativa do Alvéolo	27
4.4 Análise Quantitativa de Células Inflamatórias MN e PMN	31
4.5 Análise Imuno-histoquímica para COX-2 e 5-LO	34
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A osteoimunologia se dedica ao estudo das interações que ocorre entre as células do sistema imune e células do tecido ósseo e que são determinantes no processo de reabsorção e formação óssea (RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007; TAKAYANAGI, 2007). Desse modo, quando algo é capaz de provocar um desequilíbrio osteoimunológico, por condições de imunocomprometimento ou por drogas terapêuticas, o processo de reabsorção e formação do osso fica comprometido.

A terapêutica com bifosfonatos (BFs) é comumente realizada por pacientes portadores de doenças de caráter osteolítico a fim de se minimizar a reabsorção do tecido ósseo (CONWELL; CHANG, 2012). A inibição das funções osteoclásticas por BFs consiste em alterações morfológicas que envolvem tanto mudanças no citoesqueleto quanto na borda pregueada, membrana típica de osteoclastos em atividade (RODAN; FLEISCH, 1996). A partir de parâmetros moleculares, Mercatali *et al.* (2013) avaliaram os níveis de RANK, RANK-L e OPG em 49 pacientes portadores de patologia tumoral, os quais receberam as mesmas doses de BFs e em intervalos de tempo iguais e foram observados durante 12 meses. Ao final do estudo, observaram uma diminuição do valor de RANK-L e um grande aumento do valor de OPG, ambos comparados a linha base de normalidade. Portanto, os BFs modulam a expressão dos ligantes no sentido de inibir a ação osteoclástica. Todavia, em longo prazo, a ação dos BFs pode acarretar uma deficiência no processo de remodelação durante o reparo ósseo ou em um processo de cicatrização, por agirem inibindo funções fisiológicas dos osteoclastos (RUSSEL, 2011), bem como atuarem na supressão de células T reguladoras e de células Th17 inflamadas (ZHANG *et al.*, 2013) comprometendo funções essenciais do sistema imune.

Em um âmbito imunológico, mesmo a posologia de ácido zoledrônico por pacientes que desejam tratar doenças malignas, osteoporose ou doença óssea de Paget, pode acabar acometendo o sistema imune dos mesmos, uma vez que o medicamento induz respostas inflamatórias e uma consequente expansão de células T gamma-delta, modulando a expressão de uma diversidade de mediadores da inflamação, tais como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) nas células imunes

– macrófagos e monócitos (BRINGMANN *et al.*, 2007; PAZIANAS, 2010). No caso da osteonecrose dos maxilares (OM) induzida por BFs, a área de tecido necrótico atingida é preenchida por células do infiltrado inflamatório, composto principalmente por células plasmáticas, monócitos, linfócitos e fagócitos polimorfonucleares, recrutados da circulação sanguínea (HOEFERT *et al.*, 2015), sendo os macrófagos os principais alvos para os BFs (ROGERS *et al.*, 2011). Assim, pode-se afirmar satisfatoriamente que a inflamação atrapalha a homeostase regular do tecido ósseo (SHAW; GRAVALLESE, 2016).

Ademais, com a inibição da COX-2 o AA pode ser deslocado para a via da Lipoxigenase-5 (5-LO), uma das isoformas da LOX, para produzir anormalmente altos níveis de leucotrienos (MARTEL-PELLETIERET *et al.*, 2004). Os metabólitos da 5-LO, leucotrieno B4 (LTB4) e os leucotrienos peptídicos atuam estimulando a osteoclastogênese. Mais especificamente, o LTB4 possui função análoga ao RANK-L na diferenciação dos osteoclastos, tornando osteoclastos precursores em osteoclastos ativos. Assim, sustenta-se que a 5-LO seja um regulador negativo da formação óssea. Tais informações a respeito da 5-LO sobre o reparo ósseo confirmam os achados de Bonewald *et al.* (1997) e Manigrasso e O'Connor (2010) em estudos realizados com camundongos knockout para 5-LO (KO C), os quais revelaram o fenótipo ósseo destes animais com importante espessamento da cortical e processo de reparo mais acelerado de fratura de fêmur, respectivamente. Análise dos fêmures destes animais por meio de microtomografia computadorizada (microCT) por nós realizada, revelou também trabéculas ósseas mais espessas.

Entende-se, assim, que se fez importante a realização de estudo comparativo utilizando modelo animal com fenótipo esquelético osteopetrótico submetido à terapia antirreabsortiva em condição de reparo de ferida cirúrgica realizada na cavidade bucal, a fim de se observar até que ponto a condição óssea rege o processo de reparo, ou se o BF altera a resposta inflamatória do hospedeiro tornando-o susceptível ao desenvolvimento das osteonecroses dos maxilares (OMs), por meio da observação do curso do processo de reparo alveolar destes animais, e assim contribuindo com uma parcela para o entendimento da etiopatogenia das OMs.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivo analisar o padrão inflamatório microscópico morfológico do alvéolo e de sua mucosa adjacente e imuno-histoquímico durante o processo de reparo dos alvéolos dentários de incisivos superiores recém-extraídos de camundongos 129/Sv 5-LOKO e WT, com e sem administração de bifosfonato nitrogenado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/USC) da Universidade do Sagrado Coração – USC, Bauru, SP, atualmente denominada UNISAGRADO, protocolo nº 9589271017-2017 (Anexo 1).

3.2 Modelo experimental

Foram utilizados 80 camundongos machos da linhagem 129/Sv selvagens (WT) e geneticamente modificados para a 5-LO (5-LOKO), com idades entre 6 a 8 semanas e peso médio de 28 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto e mantidos no Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC. Os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno, com até cinco animais em cada gaiola, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada trocada duas vezes por semana. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC, sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão, recebendo água à vontade e ração sólida (Ração Ativada Produtor – Anderson & Clayton S.A.) sem restrição.

3.3 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em 4 grupos, conforme discriminado na Tabela 1.

TABELA 1 – Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido.

Identificação do grupos	n	Tratamento
Controle (WT C)	20	0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP 1x por semana
Controle tratado com ZL (WT-ZL)	20	0,5 mg/Kg de ácido zoledrônico* IP 1x por semana
5-LO (KO C)	20	0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP 1x por semana
5-LO tratado com ZL (KO-ZL)	20	0,5 mg/Kg de ácido zoledrônico* IP 1x por semana

* Zoledronic acid mononhydrate (SLM0223, Sigma-Aldrich, Darmstad, Alemanha)

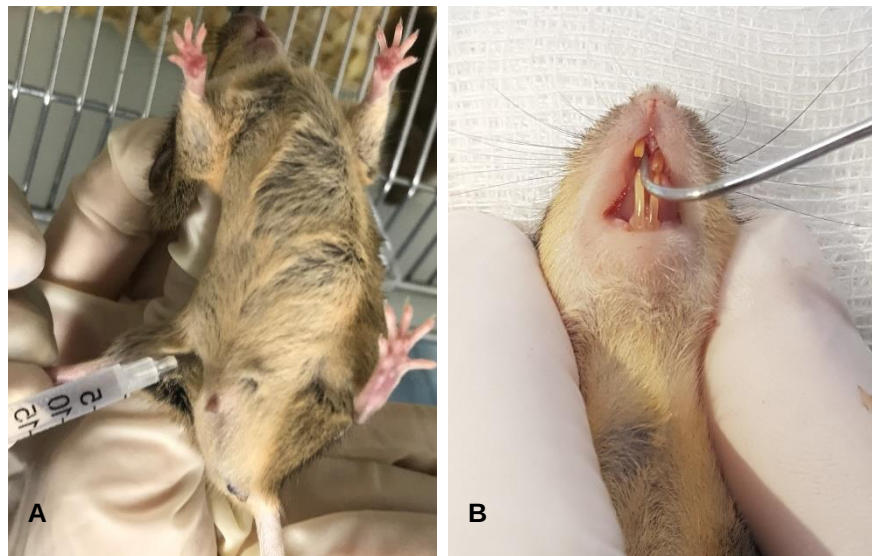
3.4 Tratamento farmacológico com ZL

Os camundongos machos jovens do grupo WT-ZL e KO-ZL foram tratados com injeções intraperitoneais (IP) 0,5mg/Kg de ácido zoledrônico (SML0223, Sigma-Aldrich, Darmstad, Alemanha) uma vez por semana durante quatro semanas.

3.5 Procedimento cirúrgico

Inicialmente todos os animais foram submetidos à sedação profunda administrada via IP, utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina (80-100mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (10mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Procedeu-se a antissepsia da cavidade bucal com polivinilpirrolidona 1% tópica (PVPI) (Dermoidine® - Gessy Lever Industrial Ltda.) e montagem dos campos cirúrgicos estéreis. Foi realizada uma incisão sucular ao redor do dente incisivo superior (ICS) direito com lâmina de bisturi número 15c. Em ato contínuo, será realizada divulsão da mucosa inserida com Hollembeck número 3s. Com pinça adaptada para este modelo animal, o dente foi luxado e extraído (Figura 1). Posteriormente, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico 0,9% estéril. Todo o procedimento foi feito com o auxílio de estereomicroscópio a fim de se possibilitar visualização satisfatória do sítio cirúrgico e evitar possíveis acidentes e traumas desnecessários. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, todos os animais foram encaminhados e mantidos em ambiente apropriado até sua completa recuperação onde receberam fosfato de codeína (Codein□□□Cristália, SP, Brasil) na dose de 50mg/kg a cada 4 horas por três dias, por via subcutânea.

Figura 1 - A) Administração de ZL via IP; B) Exodontia do incisivo superior direito



3.6 Eutanásia dos animais e coleta dos espécimes

Os animais foram selecionados ao acaso em número de 5 por grupo, em quatro tempos distintos 3, 7, 14 e 30 dias após o procedimento cirúrgico, sendo submetidos à eutanásia por meio de sobredosagem anestésica. Constatada a morte dos animais, as maxilas contendo os alvéolos extraídos foram imediatamente imersas em frascos individuais contendo formalina a 10% tamponada.

3.7 Procedimentos histotécnicos

Após a fixação por 48 horas, os espécimes foram acondicionados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Dramstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0 com trocas realizadas duas vezes por semana por 10 dias aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com navalha. As amostras foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido coronal na região média do alvéolo. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e cortes de 3µm de espessura para técnica imuno-histoquímica.

3.8 Análise histopatológica

Para os alvéolos dentários, a análise qualitativa foi feita em todos os cortes corados em HE, considerando a presença de tecido de granulação, grau de maturação do tecido ósseo, presença ou ausência de sequestros ósseos, presença ou ausência de biofilme microbiano e padrão de resposta inflamatória. No que diz respeito a análise histopatológica da mucosa sobrejacente aos alvéolos, foi realizada considerando a qualidade do revestimento com presença ou ausência de atrofia/hiperplasia, acantose, grau de queratinização, exocitose, bem como as condições da lâmina própria, qualidade do tecido conjuntivo e tipo de infiltrado inflamatório, se presente.

3.9 Técnica imunohistoquímica

Para a determinação dos padrões moleculares da região de reparo ósseo foram selecionados os seguintes alvos: COX-2 e 5-LO. Para tanto, cortes de 3 µm 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, foram utilizados os anticorpos primários monoclonais anti-COX-2 (SC#1474, SantaCruz Biotechnology, Carpinteria, EUA) e anti-5LO (SC#136195), em ambiente refrigerado por 1 hora, e lavados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Após isso, os cortes incubados com o anticorpo primário foram incubados com o kit Histofine (Mousetain kit, Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japão), e em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com Hematoxilina de Harris (para COX-2) e Fast Green (para 5-LO).

3.10 Análise histomorfométrica

A análise quantitativa dos alvéolos dentários foi feita em todos os cortes corados em HE e pela imuno-histoquímica, sendo capturados 10 campos em objetivas de 100x de cada alvéolo. Para se realizar a histomorfometria foi

determinado um retículo no *software ImageJ* contendo 120 pontos, a fim de se quantificar: fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, matriz óssea, osteócitos e lacuna, osteoblastos e leucócitos. Além disso, usando o mesmo *software*, foi quantificado: leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares plasmócitos e linfócitos. O mesmo foi realizado para quantificação das células imunomarcadas pela COX-2 e 5-LO.

3.11 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos a partir das análises quantitativas foram analisados quanto à sua distribuição de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk a fim de se definir os testes apropriados a serem aplicados, paramétricos ou não paramétricos, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) e foram aplicados através dos programas *GraphPadInStat* e *Prism5* (GraphPad, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

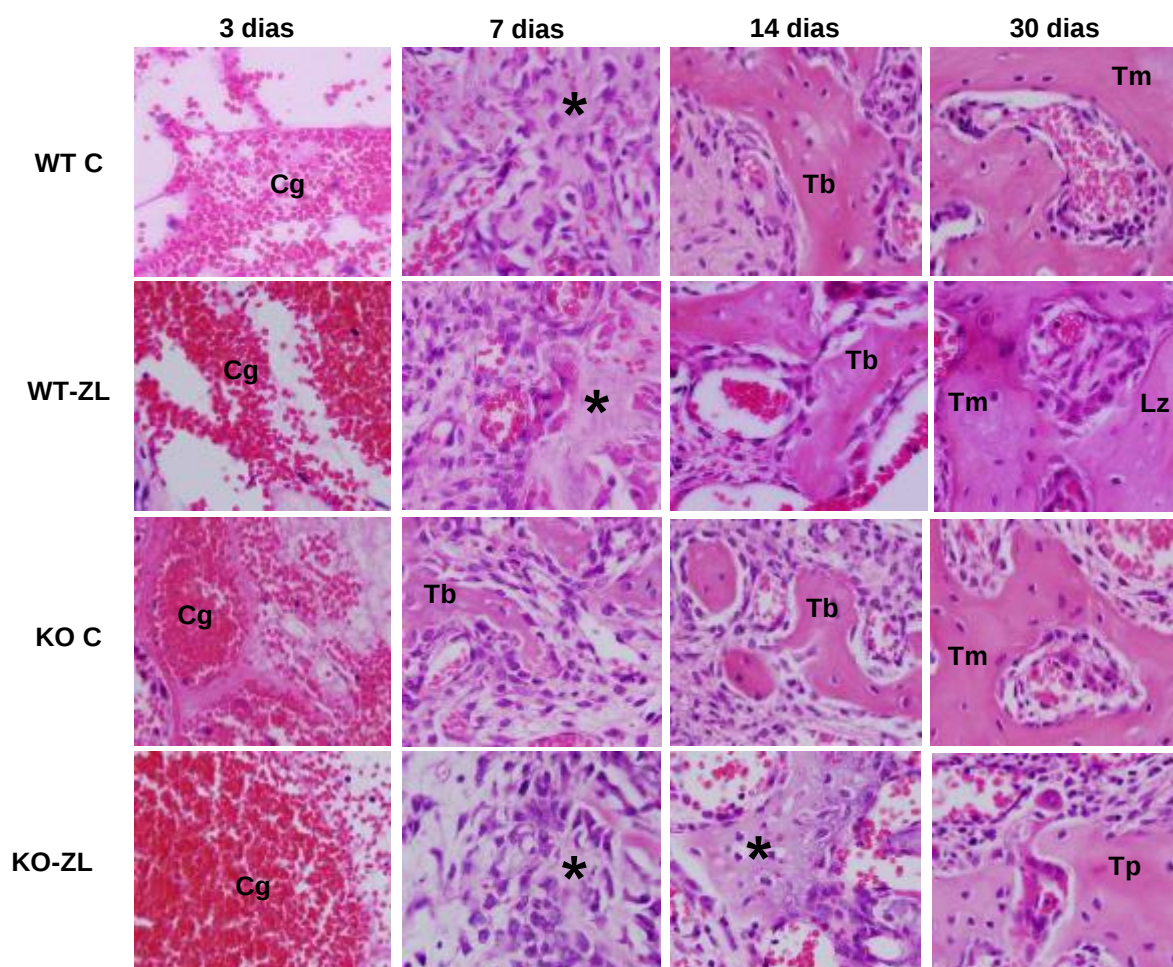
4.1 Descrição Morfológica Microscópica Qualitativa do Alvéolo

Aos 3 dias pós-operatório não foram observadas diferenças microscópicas que distinguíssem um grupo de outro, sendo que os alvéolos se encontravam preenchidos predominantemente por coágulo sanguíneo. A partir dos 7 dias, entretanto, algumas diferenças importantes foram detectadas. O grupo WT C seguiu o curso de reparo dentro da normalidade, sendo que aos 7 dias foi possível notar neoformação óssea evidente a partir das paredes do alvéolo, estando a porção central preenchida predominantemente por tecido de granulação e presença de atividade osteogênica identificada pela presença de células osteoblásticas associadas a matriz mineralizada irregular, caracterizando neoformação óssea. Aos 14 dias já era possível identificar as trabéculas ósseas maduras, recobertas por células de revestimento e permeadas por espaços medulares definidos. Quando da associação com BF (grupo WT-ZL), chamou atenção a presença de focos de coágulo sanguíneo em meio a áreas de atividade osteogênica no interior dos alvéolos. A matriz óssea depositada abrigava osteócitos mais evidentes, em meio a matriz irregular circundada por osteoblastos ora colunares, ora irregulares em sua morfologia. Moderado infiltrado inflamatório mononuclear (MN) difuso pôde ser observado. Aos 30 dias, as trabéculas ósseas encontravam-se mais evidentes, no entanto, com áreas centrais irregulares e linhas de reversão também irregulares. As lacunas de osteócitos mostravam-se ora evidentes e de contorno irregulares, ora pequenas e vazias, conferindo um aspecto distinto na matriz. Neste período, ainda era possível visualizar a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos.

De modo diferente, aos 7 dias pós-operatório o grupo KO C já apresentava trabéculas mais definidas que o grupo WT C, no entanto, mais delgadas e entremeadas por células osteoblásticas em meio a tecido conjuntivo frouxo. Aos 14 dias as trabéculas ósseas estavam mais organizadas e aos 30 dias, encontravam-se robustas e maduras. Por toda a extensão do alvéolo foi possível notar infiltrado inflamatório MN e PMN difuso. Aos 7 dias, o grupo KO-ZL apresentava atividade osteogênica com deposição de matriz irregular em meio a focos de coágulo. De permeio notou-se infiltrado inflamatório difuso MN e PMN. No período de 14 dias já

se observava trabéculas regulares localizadas nas paredes dos alvéolos, ora com osteócitos evidentes, ora com lacunas pequenas e vazias, em meio a tecido de granulação com focos de infiltrado predominantemente MN. A matriz apresentava numerosas linhas de reversão irregulares, bem como discretas áreas semelhantes à “algodão”. Aos 30 dias, tem-se trabéculas ósseas em sua maioria ainda primárias e irregulares, ricas em osteócitos aprisionados em grandes lacunas. Observam-se osteoclastos ora aderidos à superfície óssea, ora arredondados e não aderidos à matriz. Focos de leucócitos MN e eventuais PMNs também estão presentes. Detalhes da análise histopatológica podem ser observadas na Figura 1.

FIGURA 1 – Aos 3 dias, observa-se predomínio de coágulo (Cg) em todos os grupos. Aos 7 dias observa-se atividade osteogênica (*) nos grupos WT C, WT-ZL e KO-ZL. Já no KO C, as trabéculas mostram-se regulares (Tb). Aos 14 dias tem-se trabéculas regulares (Tb) nos grupos WT C, WT-ZL e KO C, enquanto que o grupo KO-ZL ainda apresenta-se em atividade osteogênica. Aos 30 dias, os grupos WT C, WT-ZL e KO C apresentavam um osso trabeculado maduro (Tm), porém, no grupo KO-ZL estava presente trabéculas ainda primárias (Tp). Além disso, para o grupo WT-ZL chama-se atenção para as lacunas vazias (Lz) (HE; aumento original 100x)

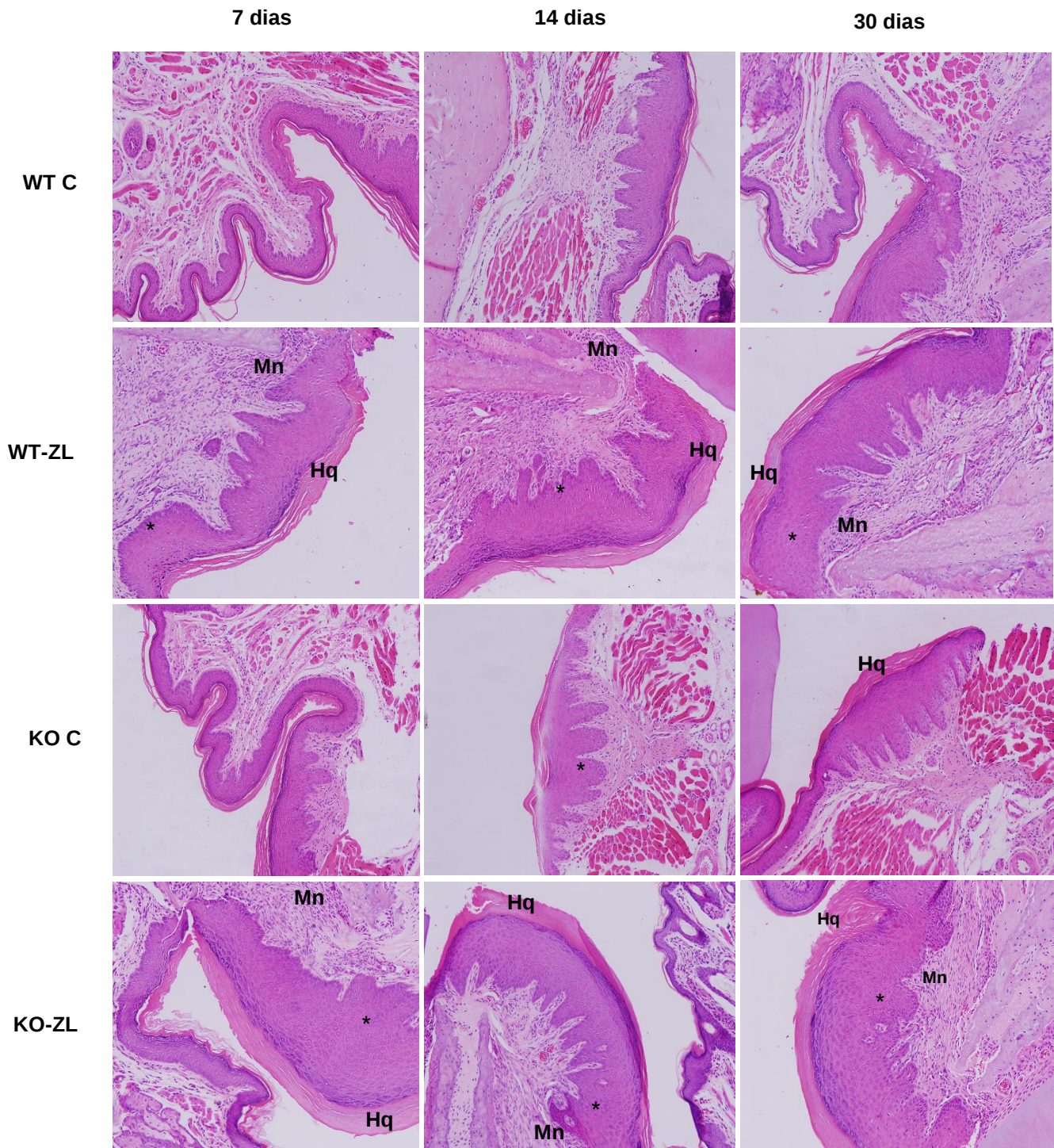


4.2 Descrição Morfológica Microscópica Qualitativa da Mucosa

Aos 7 dias pós-operatórios não foram observadas diferenças microscópicas que distinguíssem os grupos WT C e KO C, sendo que as mucosas sobrejacentes aos alvéolos se encontravam dentro da normalidade. Por sua vez, os grupos WT-ZL e KO-ZL apresentavam aos 7 dias áreas de acantose, hiperortoqueratinização da camada córnea, bem como presença de exocitose com focos de infiltrado inflamatório MN visíveis na lâmina própria íntegra. Aos 14 dias o grupo WT C apresentou características da mucosa muito semelhantes àquelas vistas aos 7 dias, com epitélio estratificado pavimentoso sem alterações, camada córnea com grau de queratinização compatível com a normalidade – ortoqueratinizado –, não foi observada exocitose significativa e a lâmina própria apresentava-se íntegra sendo composta por tecido conjuntivo propriamente dito denso não modelado. A partir dos 30 dias, entretanto, o epitélio apresentava regiões acantóticas, mantendo normalidade na camada córnea e na lâmina própria. Quando da associação com BF (grupo KO-ZL), aos 14 dias, chamou a atenção um epitélio acantótico pelo espessamento da camada espinhosa, com uma camada córnea completamente hiperortoqueratinizada, bem como a presença de focos de infiltrado inflamatório crônico presentes na lâmina própria. Aos 30 dias, as alterações epiteliais e a exocitose se mantiveram.

De modo semelhante ao grupo WT C, aos 14 dias pós-operatório o grupo KO C apresentava características histológicas epiteliais e conjuntivas muito semelhantes àquelas observadas em seu período de 7 dias, com exceção de pequenas áreas que se mostravam com leve acantose. Já aos 30 dias pós-operatório a mucosa mostrava-se mais regular, com alterações restritas às regiões de hiperortoqueratinização da camada córnea. Aos 14 dias e 30 dias, o grupo KO-ZL apresentava as mesmas anormalidades vistas aos 7 dias, retratadas por uma mucosa alterada devido a um epitélio acantótico com hiperortoqueratinização e focos de infiltrado inflamatório MN, com predominância de linfócitos, principalmente, presentes na lâmina própria. Os aspectos histopatológicos dos grupos podem ser observados na Figura 2.

FIGURA 2 – Observadas áreas de acantose (*) e hiperortoqueratinização (Hq) aos 7 dias nos grupos WT-ZL e KO-ZL. Nos grupos tratados com ZL, aos 14 dias, observou-se focos de infiltrado inflamatório mononuclear (Mn) e aos 30 dias as condições se mantiveram. No grupo WT C e KO C, aos 30 dias, foi observado leve acantose (*) e notou-se área de hiperortoqueratinização (Hq), respectivamente (HE; aumento original 20x)



4.3 Análise Morfológica Microscópica Quantitativa do Alvéolo

Para os animais do grupo WT C, foi notado diferença estatisticamente significativa entre WT C 7 dias vs KO C 7 dias, com níveis elevados de fibroblastos do grupo KO C (Figura 3.B). Além disso, houve diferença estatisticamente significativa entre WT C vs WT-ZL no período de 30 dias com relação ao nível elevado de osteoclastos aderidos nos animais WT-ZL (Figura 3.I) e também observou-se diferença estatisticamente significativa com relação aos níveis de células inflamatórias entre WT C vs WT-ZL no período de 14 dias, com maiores níveis no grupo WT C, e entre os animais WT C 30 dias vs KO C 30 dias, com níveis elevados para o grupo KO C (Figura 3.J). Por fim, foram conservados os níveis de vasos sanguíneos, fibras, matriz óssea, osteócitos, lacunas vazias, osteoblastos, osteoclastos desaderidos, coágulo e outros do grupo WT.

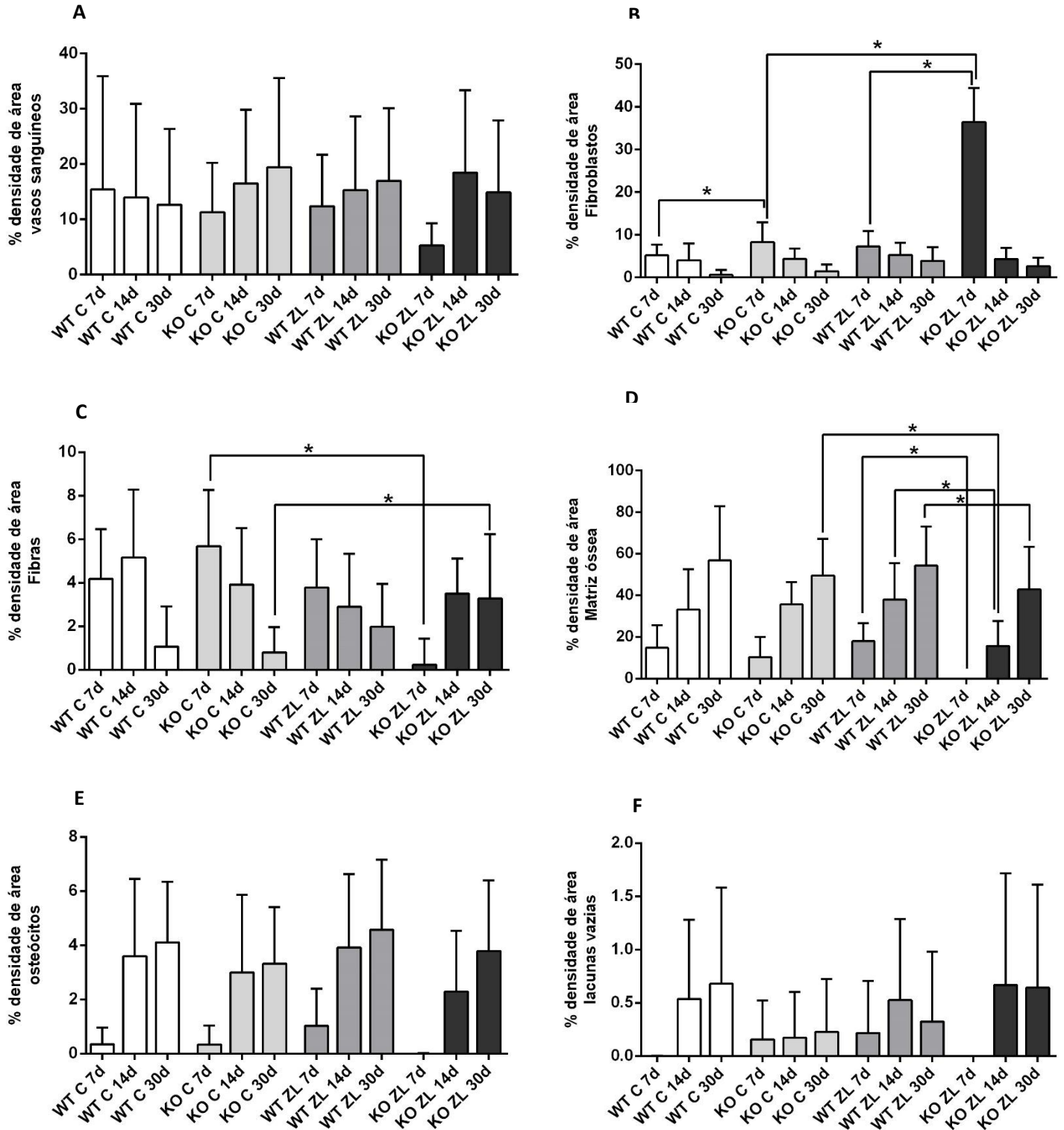
O grupo de animais WT-ZL foi o que apresentou maiores diferenças estatisticamente significantes, podendo ser citado um baixo nível de fibroblastos quando comparado WT-ZL 7 dias vs KO-ZL 7 dias (Figura 3.B); níveis elevados de matriz óssea quando comparado todos os períodos do WT-ZL vs KO-ZL (Figura 3.D); alto nível de osteoblastos quando confrontado o grupo WT-ZL vs KO-ZL aos 7 dias (Figura 3.G); níveis aumentados de osteoclastos aderidos aos 30 dias na comparação entre WT-ZL vs WT C (Figura 3.H); níveis baixos de células inflamatórias na comparação do WT-ZL vs WT C e WT-ZL vs KO-ZL, ambos aos 14 dias (Figura 3.J) e por último, baixos níveis da categoria “outros” quando na comparação entre WT-ZL vs KO-ZL aos 14 dias e 30 dias (Figura 3.L). Nas demais categorias (vaso sanguíneos, fibras, osteócitos, lacunas vazias, osteoclasto desaderido e coágulo) os níveis foram conservados quando confrontados com os outros grupos de animais.

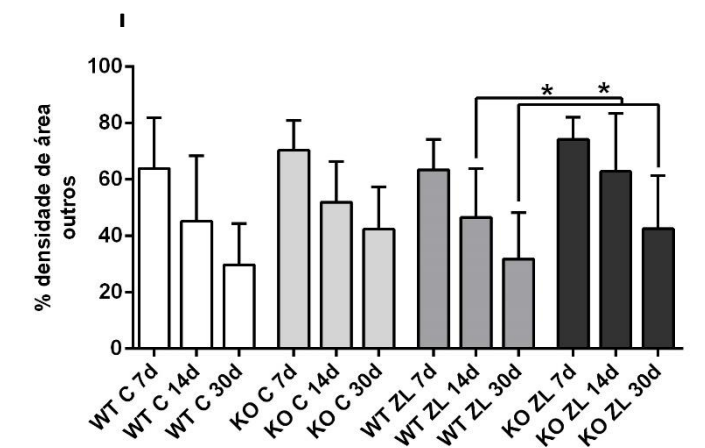
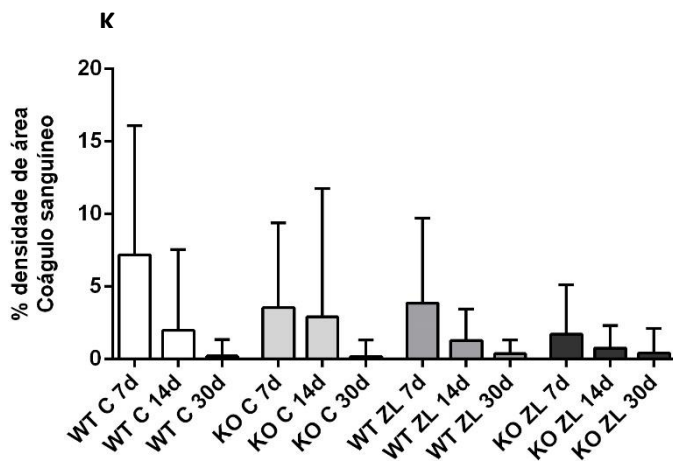
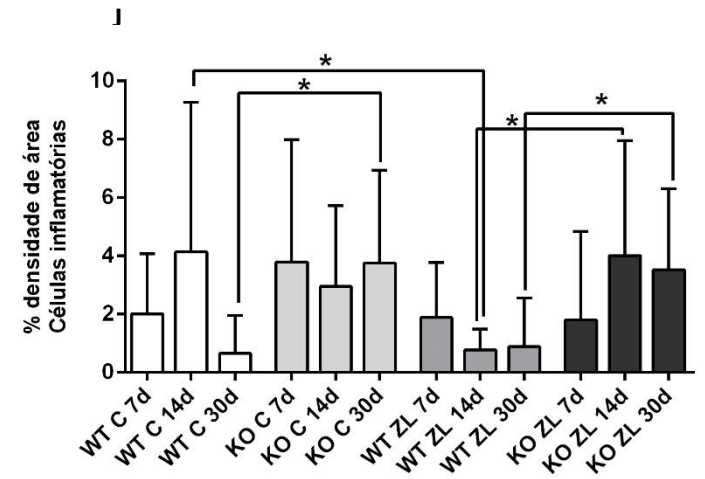
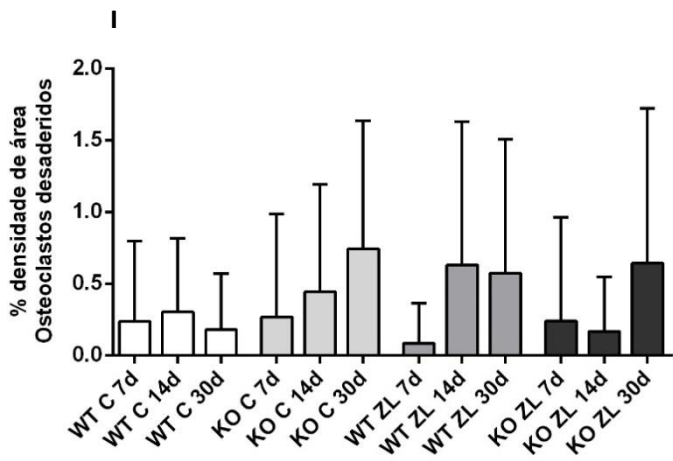
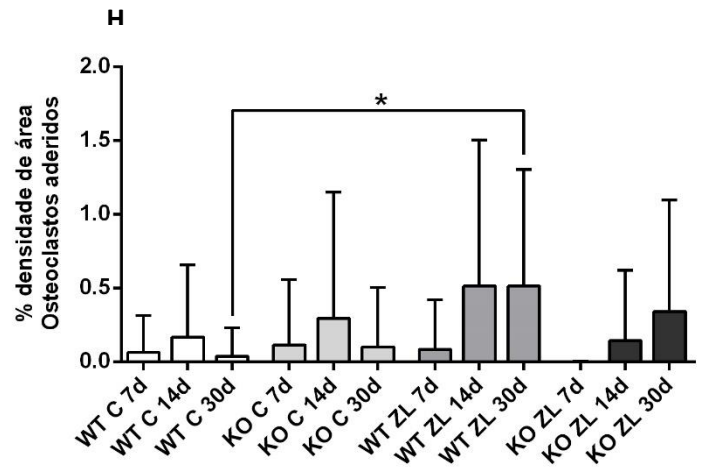
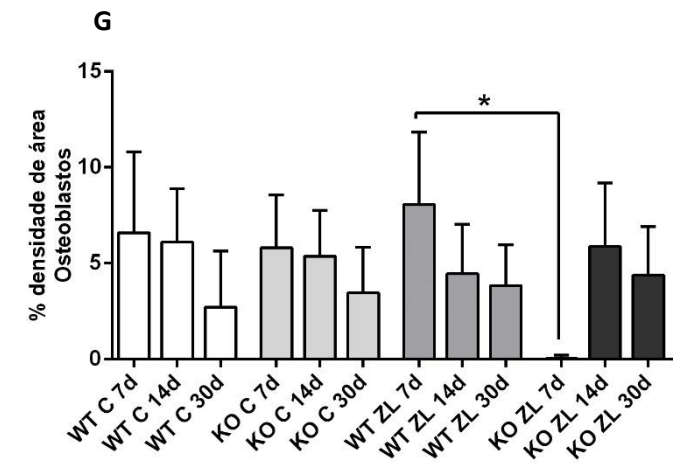
Os resultados apresentados pelo grupo KO C revelam que houve diferença estatisticamente significativa com baixos níveis de fibroblastos quando comparados aos animais KO-ZL no período de 7 dias (Figura 3.B); níveis elevados de fibras quando confrontados com KO-ZL no período de 7 dias (Figura 3.C); elevada porcentagem de matriz óssea a partir da comparação com o grupo KO-ZL aos 14 dias (Figura 3.D); e elevados níveis de células inflamatórias na comparação com o

grupo WT C no período de 30 dias (Figura 3.J). Para os outros parâmetros, foram conservados os níveis durante os três períodos.

Por fim, temos que os resultados do grupo KO-ZL revelam diferença estatisticamente significantes com elevados níveis de fibroblastos aos 7 dias quando comparado aos grupos KO C e WT-ZL (Figura 3.B); com baixos níveis de fibras aos 7 dias e altos níveis aos 30 dias quando confrontado com o grupo KO C (Figura 3.C); baixos níveis de matriz óssea aos 7, 14 e 30 dias na comparação com os grupos WT-ZL, KO C e WT-ZL, respectivamente, e altos níveis aos 14 dias comparado ao grupo WT-ZL (Figura 3.D); baixos níveis de osteoclastos aos 7 dias quando comparado ao outro grupo de animais medicados (WT-ZL) (Figura 3.G); altos níveis de células inflamatórias aos 14 e 30 dias na comparação com os mesmo períodos do grupo WT-ZL (Figura 3.J). Os demais parâmetros não citados com diferença estatisticamente significativa, mantiveram os níveis entre os outros grupos.

FIGURA 3 - Resultados estatísticos referentes às análises histomorfométricas dos alvéolos. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$





Fonte: Autor, 2022

4.4 Análise Quantitativa de Células Inflamatórias MN e PMN

Para os animais do grupo WT C, não foi notado diferença estatisticamente significativa no que diz respeito a análise dos leucócitos MN e leucócitos PMN neutrófilos quando comparado aos outros grupos e até mesmo entre seus períodos, mantendo níveis estáveis durante o processo de reparo alveolar.

O grupo de animais WT-ZL foi o que apresentou maiores diferenças estatisticamente significantes, com menor número de leucócitos MN quando comparado ao WT-ZL 7 dias vs KO C 7 dias; foi observado também menor número de linfócitos e plasmócitos quando se comparou WT-ZL 30 dias vs KO-ZL 30 dias (Figura 4.A); com relação à quantidade de leucócitos PMN neutrófilos, o grupo WT-ZL manteve as maiores diferenças estatisticamente significantes com menor quantidade comparado WT-ZL 30 dias vs KO C 30 dias e WT-ZL 30 dias vs KO-ZL 30 dias (Figura 4.B).

Os resultados apresentados pelo grupo KO C, revelam que houve diferença estatisticamente significativa com maior quantidade de leucócitos MN quando comparados aos animais WT-ZL no período de 7 dias (Figura 4.A); maior número de leucócitos PMN neutrófilos foi observado quando confrontados com o WT-ZL no período de 30 dias (Figura 4.B).

Por fim, o grupo KO-ZL revelou diferenças estatisticamente significantes com maior número de leucócitos MN aos 30 dias quando comparado ao grupo WT-ZL (Figura 4.A); e maior quantidade de leucócitos PMN neutrófilos aos 30 dias quando confrontado com o grupo WT-ZL (Figura 4.B).

TABELA 2 – Médias e desvio-padrão obtidos a partir da análise histomorfométrica. Foi observado distribuição dos valores para alguns grupos fora da normalidade, utilizando teste de Shapiro-Wilk, assim, optou-se pelo teste estatístico não paramétrico Kruskal Wallis seguido de Dunn, considerando nível de significância de 5%

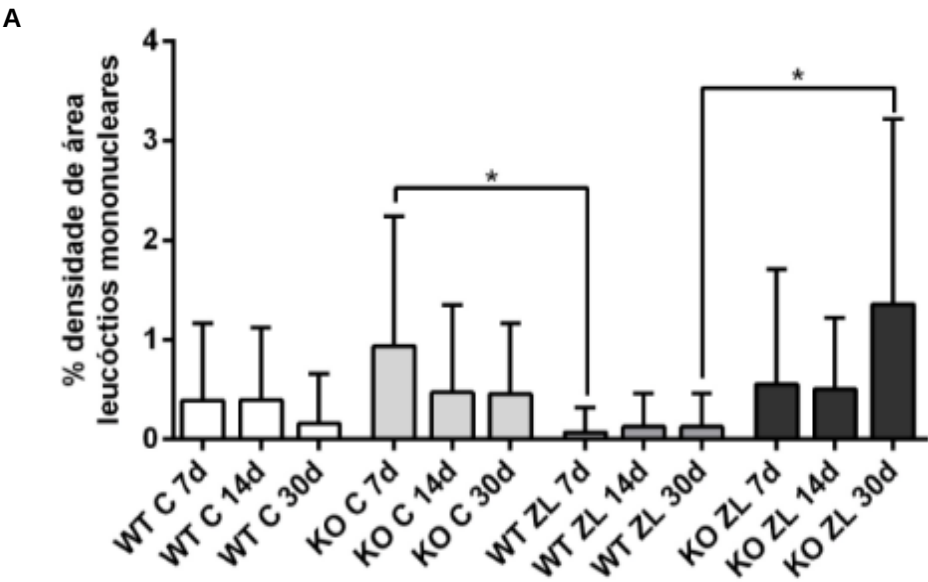
A

		Leucóitos Mononucleares (MN)											
		WT C 7d	WT C 14d	WT C 30d	KO C 7d	KO C 14d	KO C 30d	WT ZL 7d	WT ZL 14d	WT ZL 30d	KO ZL 7d	KO ZL 14d	KO ZL 30d
Média		0,3889	0,3953	0,1579	0,9333	0,4706	0,4545	0,06667	0,125	0,125	0,5526	0,5	1,36
Desvio padrão		0,7775	0,7283	0,5015	1,304	0,8798	0,7111	0,2515	0,3349	0,3349	1,155	0,7223	1,858

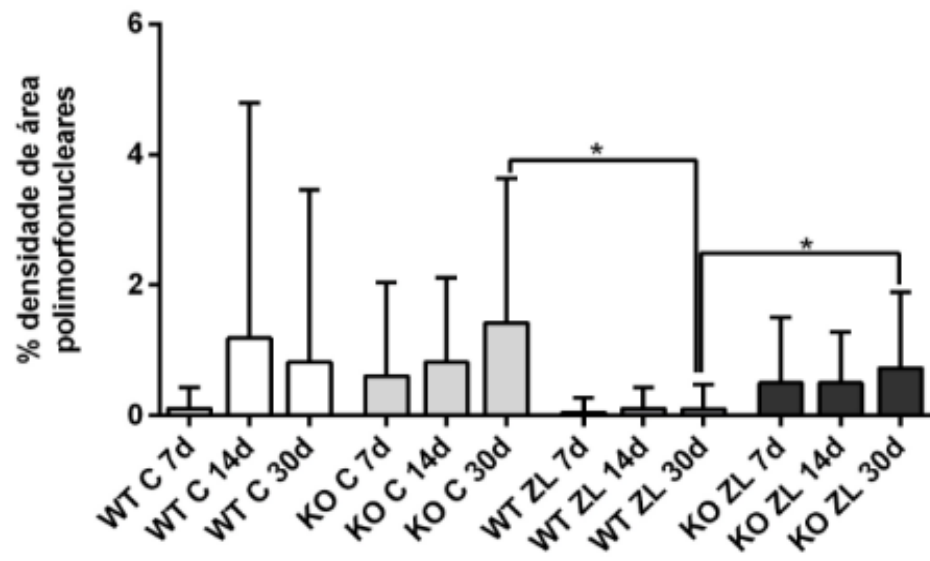
B

		Leucócitos Polimorfonucleares (PMN)											
		WT C 7d	WT C 14d	WT C 30d	KO C 7d	KO C 14d	KO C 30d	WT ZL 7d	WT ZL 14d	WT ZL 30d	KO ZL 7d	KO ZL 14d	KO ZL 30d
Média		0,1111	1,186	0,8214	0,6136	0,8235	1,424	0,05	0,1111	0,1	0,5	0,5	0,7312
Desvio padrão		0,3234	3,614	2,639	1,434	1,292	2,208	0,2207	0,3234	0,3789	1,007	0,7802	1,162

FIGURA 4 – Representação gráfica dos resultados obtidos pela análise histomorfométrica dos grupos MN e PMN. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos e períodos .



B



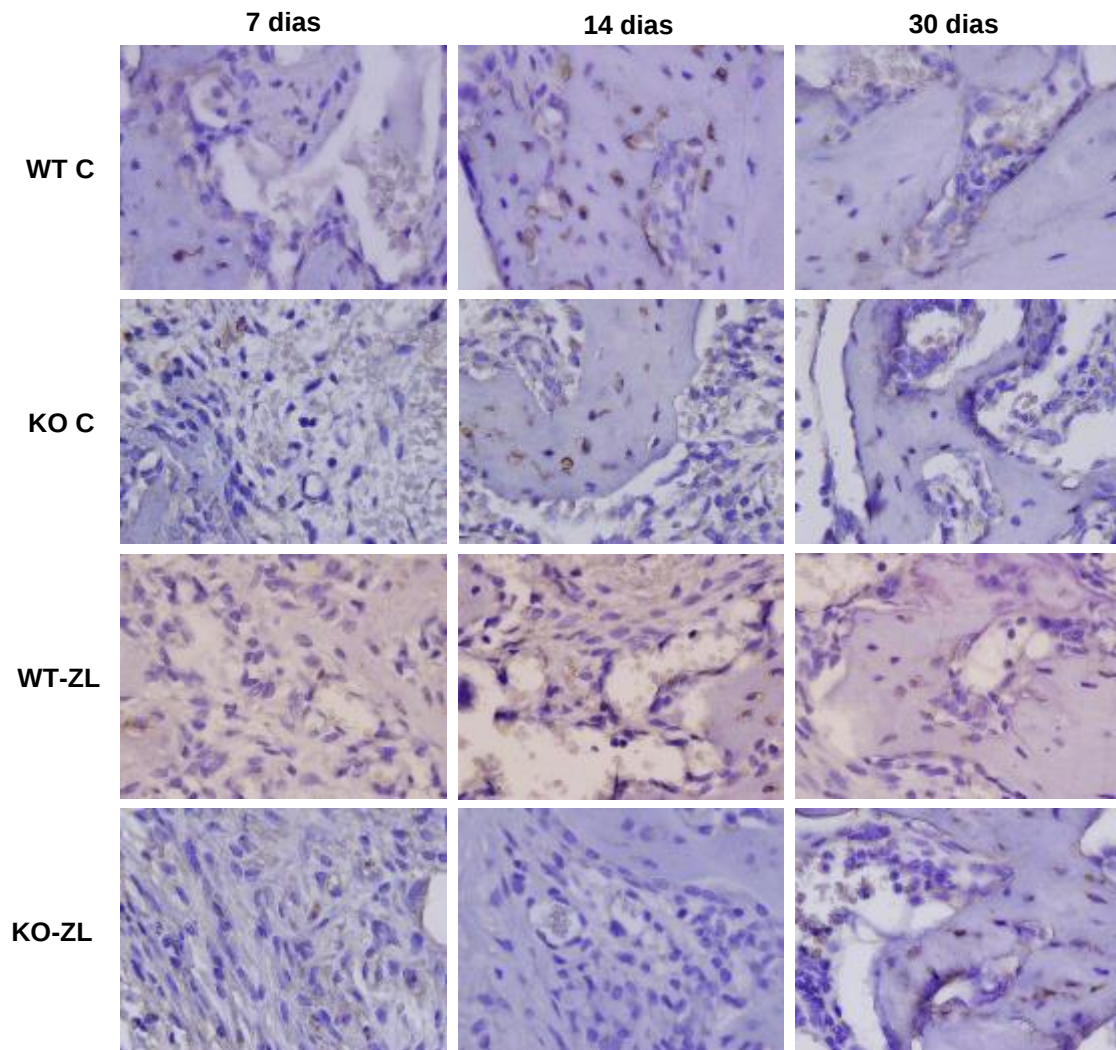
Fonte: Autor, 2022

4.5 Análise Imuno-histoquímica para COX-2 e 5-LO

Referente a imunomarcção para COX-2, foram realizadas análises descritiva e quantitativa, assim, na análise histopatológica, observou-se marcação positiva para a enzima COX-2 nas células do tecido ósseo, como osteócitos e osteoblastos, bem como nas células inflamatórias (Figura 5). Além disso, os resultados estatísticos revelaram que o grupo WT C apresentou aumento significativo das células imunomarcadas para COX-2 no período de 14 dias em comparação ao período de 30 dias. Na comparação entre os demais grupos e períodos, não foi detectada diferença estatisticamente significativa (Figura 6).

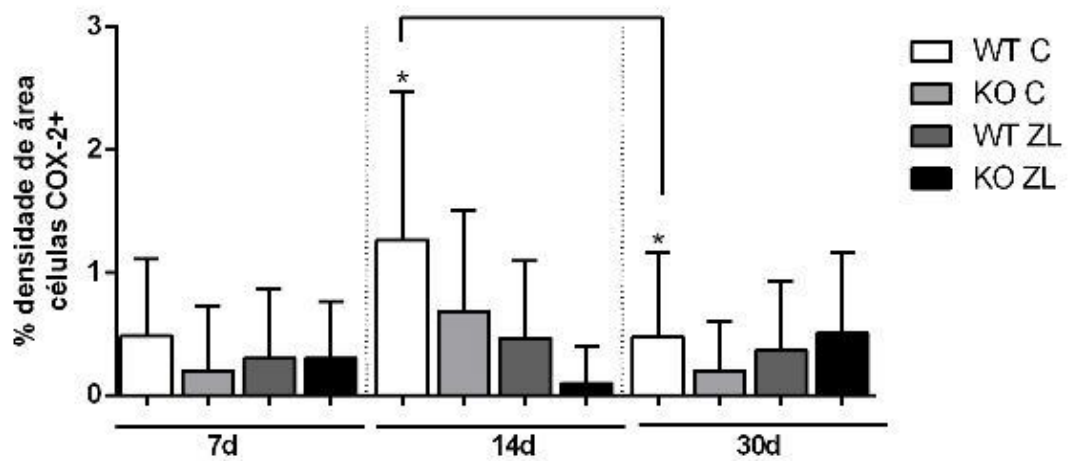
Para a análise imuno-histoquímica da 5-LO, foi realizada apenas análise descritiva das células imunomarcadas. Observou-se marcação de 5-LO no período de 7 dias no grupo WT-ZL. Nesse período, para o grupo dos animais WT C foi observado marcação predominantemente citoplasmática, indicando um possível estágio de ativação da enzima. Já no grupo dos animais tratados com ZL, houve uma marcação predominantemente na membrana nuclear. No período de 14 dias no grupo WT C, ainda podia ser notado persistência de marcação da 5-LO predominantemente no citoplasma das células inflamatórias. No entanto, não foi observado marcação nesse período no grupo WT-ZL (Figura 7). No grupo WT C 30 dias e no grupo WT-ZL, 14 e 30 dias, não houve marcação plausível de análise da 5-LO, sendo observado apenas hemácias intravasculares e elementos de matriz extracelular corados.

FIGURA 5 – Marcação imunohistoquímica para COX-2 nos osteoblastos, osteócitos e leucócitos (aumento original 100x)



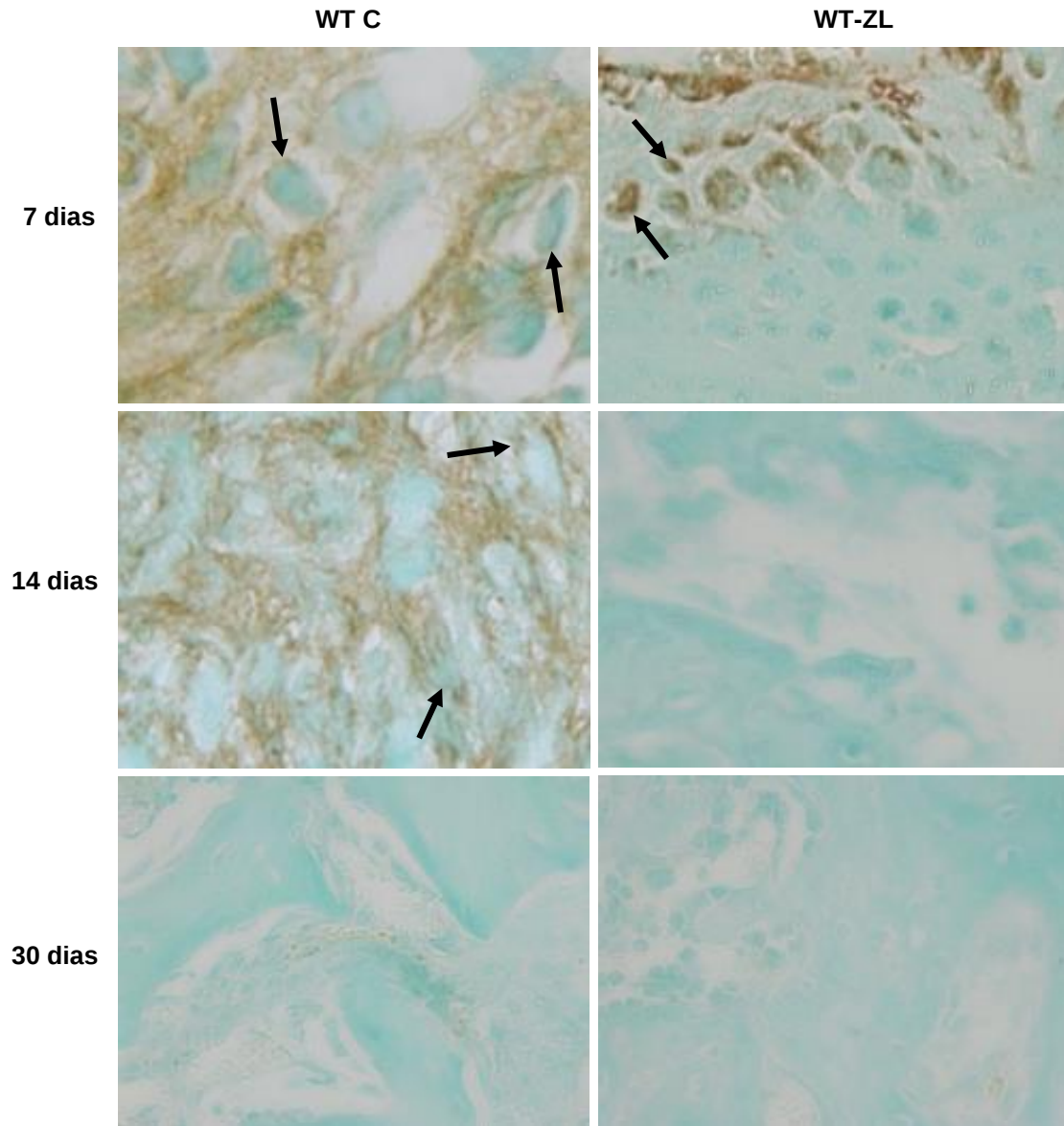
Fonte: Autor, 2022

FIGURA 6 – Gráfico representativo da marcação de COX-2 entre os grupos e períodos. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes. Resultados obtidos foram submetidos aos testes de Kruskal Wallis seguido de Dunn considerando o nível de significância de 5%



Fonte: Autor, 2022

FIGURA 7 – Setas indicam células marcadas positivamente para 5-LO com imunomarcção predominantemente citoplasmática no grupo WT C e predominantemente na membrana nuclear no grupo WT-ZL (aumento original 100x)



Fonte: Autor, 2022

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a terapêutica com bifosfonatos nitrogenados (BFs) é comumente realizada por pacientes portadores de doenças de caráter osteolítico a fim de se minimizar a reabsorção do tecido ósseo (CONWELL; CHANG, 2012), de modo que a inibição das funções osteoclásticas pelos BFs consiste em alterações morfológicas que envolvem tanto mudanças no citoesqueleto quanto na borda pregueada, membrana típica de osteoclastos em atividade (RODAN; FLEISCH, 1996), tornando-o, assim, inativo para reabsorção óssea.

No presente estudo, foram utilizados como modelos animais camundongos da linhagem 129Sv como modelos experimentais devido à sua semelhança fisiológica com o organismo humano (DUTTA; SENGUPTA, 2016), assim, facilitando e trazendo para mais próximo os eventos gerais, sendo como enfoque do trabalho o metabolismo ósseo.

Os resultados apresentaram aspectos interessantes sobre o modelo animal em questão. A dose de 500µg/Kg parece ter sido insuficiente para alterar de maneira importante o processo de reparo alveolar, considerando-se o os resultados obtidos pelos testes estatísticos, não tendo sido detectadas diferenças nos parâmetros: vasos sanguíneos, lacunas vazias, osteócitos, osteoclastos não aderidos e coágulos, o que nos faz questionar a instalação da osteonecrose neste modelo. Apesar disso, parâmetros importantes como o infiltrado inflamatório e matriz óssea neoformada revelou que os animais com inibição da enzima 5-LO (KO C) sofreram uma influência mais significativa do BF, refletindo um atraso no reparo ósseo na comparação dos períodos. Se somente os valores numéricos fossem considerados, poderíamos concluir que não houve instalação de osteonecrose. No entanto, o aspecto histopatológico revelou morfologias importantes que devem ser consideradas.

Na análise do grupo WT C, notou-se claramente que o curso biológico do reparo ocorreu dentro dos padrões de normalidade (VIEIRA *et al.*, 2015). Na presença de BF (WT ZL), apesar de a matriz óssea já ser visualizada aos 7 dias, a mesma se encontrava irregular com contornos difusos, com infiltrado inflamatório evidente, o qual persistiu até os 30 dias. O grupo KO C, mostrou reparo alveolar acelerado aos 7 dias, confirmando informações já descritas previamente

(BONEWALD *et al.*, 1997). Quando da associação com BF (KO ZL), ficou evidente um atraso no processo de reparo alveolar, com atividade osteogênica perdurando até os 14 dias. Assim sendo, o grupo que aparentemente foi mais afetado pela dose do medicamento, especialmente quando comparado com o WT ZL, foi o KO ZL. Chamou a atenção neste grupo (KO ZL) suas características histopatológicas. No período de 14 dias, as trabéculas ósseas primárias exibiam osteócitos com núcleos ora grande e evidentes, ora picnóticos em grandes lacunas. Eventualmente, a matriz óssea mostrava-se irregular, semelhante a “algodão”, sendo que essa característica persistiu até os 30 dias.

No que diz respeito à mucosa sobrejacente ao alvéolo, na análise do grupo WT C, notou-se uma condição de normalidade desta mucosa, exceto por pequenas áreas do epitélio aos 30 dias que apresentavam leve acantose. Na presença de BF (WT ZL), houve importantes alterações, porém características dose-dependentes descritas por Scheper *et al.* (2009), em estudo *in vitro*, não foram evidenciadas em nenhum dos períodos analisados, visto que apesar de ter sido observado espessamento da camada espinhosa do epitélio hiperortoqueratinização da camada córnea, a presença de queratinócitos e fibroblastos apoptóticos não foi detectada, sugerindo que provavelmente a dose administrada de 500µg/Kg não foi suficiente para ocasionar tais eventos patológicos em nosso modelo animal – camundongo 129Sv macho jovem. Apesar disso, confirmou-se a ação dos bifosfonatos sobre as funções do recrutamento dos neutrófilos (KUIPER *et al.*, 2011) nesse grupo, tanto pela ausência significativa de leucócitos polimorfonucleares na lâmina própria, perceptível pela análise descritiva da mucosa, como pelos resultados estatísticos expressivos com níveis muito baixos dessas células polimorfonucleares quando comparado aos outros grupos.

O grupo KO C, apresentou condições dos tecidos moles da mucosa bucal sem alterações aos 7 dias, porém aos 14 e 30 dias foram observadas alterações isoladas em cada período, retratadas por leve acantose e áreas restritas de hiperortoqueratinização, respectivamente. Além disso, embasado nos achados de Rådmark *et al.* (2009) em que relatam que um dos eventos relacionados com a metabolização do ácido araquidônico pela via 5-LO é a migração de leucócitos dos vasos para os tecidos, em nosso modelo animal *knockout* para enzima 5-LO não foi observada exocitose quando analisado os tecidos moles da mucosa bucal, ou seja,

concordando com os achados dos autores citados. No que diz respeito a quantificação dos neutrófilos e leucócitos MN durante o processo de reparo no interior do alvéolo, esse grupo apresentou níveis estatísticos significantes de leucócitos MN quando comparado com o grupo WT-ZL no período de 7 dias e de neutrófilos quando comparado com o mesmo grupo aos 30 dias, o que era esperado visto os períodos e especialmente o grupo comparado (WT-ZL), conhecendo os efeitos negativos dos BFs sobre a função e quimiotaxia dos neutrófilos (FAVOT; FOSTER; GLOGAUER, 2013).

Descrevendo o grupo KO-ZL, ficou evidente que os animais tratados com BF (WT-ZL e KO-ZL) foram os que mais sofreram influências negativas do medicamento, com alterações nos tecidos moles da mucosa bucal e com interferências sobre o recrutamento de neutrófilos para os tecidos, independente da deleção da 5-LO. Chama atenção o fato de que nesses grupos de animais tratados com ZL, focos de infiltrado inflamatório MN foram observados em todos os períodos analisados. Além disso, o grupo KO-ZL apresentou diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo WT-ZL aos 30 dias.

Com relação aos resultados revelados através da técnica imuno-histoquímica da enzima 5-LO, chamou atenção os diferentes locais de marcação da enzima dependendo do grupo analisado, ora sendo citoplasmática ora nuclear, WT C e WT-ZL, respectivamente. Nesse âmbito, Rådmark *et al.* (2009) a partir de seus estudos observaram que a localização da enzima 5-LO varia de acordo com a atividade metabólica celular, ou seja, nos leucócitos em repouso a enzima é encontrada no citosol celular ou em compartimentos solúveis nucleares e quando ativos a 5-LO encontra-se na membrana nuclear. Quando confrontados com nossos achados, temos que no grupo WT C, no período de 7 e 14 dias, a predominância dos leucócitos encontram-se em repouso, considerando-se o local de marcação da 5-LO no citosol. No grupo WT-ZL, a marcação nuclear sugere a ação da enzima 5-LO na presença do medicamento no período inicial do reparo. Nos animais KO controle e tratados com medicação, a imuno-histoquímica não foi realizada pela deleção genética da enzima.

Com relação à imuno-marcação da enzima COX-2, a mesma não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos com exceção do WT C entre o período de 14 e 30 dias, com diminuição de COX-2 aos 30 dias.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que o tratamento com ZL influenciou de maneira mais importante os animais *knockout* para enzima 5-LO, alterando o reparo da mucosa bucal sobrejacente ao alvéolo e o curso do reparo alveolar intramembranoso, com o aumento do infiltrado inflamatório, e influenciando negativamente a neoformação óssea.

No reparo ósseo, o medicamento parece estimular a produção da enzima 5-LO nos períodos iniciais, observados nos animais WT C, sem no entanto, alterar níveis de COX-2.

REFERÊNCIAS

BONEWALD, L. F. *et al.* Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. **Adv Exp Med Biol.**, v. 433 (1997): 299-302. doi:10.1007/978-1-4899-1810-9_63.

BRINGMANN, A. *et al.* Zoledronic acid inhibits the function of Toll-like receptor 4 ligand activated monocyte-derived dendritic cells. **Leukemia.**, v. 21,4 (2007): 732-8. doi:10.1038/sj.leu.2404556.

CONWELL, L. S.; CHANG, A. B. Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev.**, ,4 CD002010. 18 Apr. 2012, doi:10.1002/14651858.CD002010.pub3.

FAVOT, C. L.; FOSTER, C.; GLOGAUER, M. The effect of bisphosphonate therapy on neutrophil function: a potential biomarker. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 42,5 (2013): 619-26. doi:10.1016/j.ijom.2012.12.011.

HOEFERT, S. *et al.* Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases. **Clin Oral Investig.**, v. 19,2 (2015): 497-508. doi:10.1007/s00784-014-1273-7.

LIAO, D. *et al.* Inhibition of 5-lipoxygenase represses neutrophils activation and activates apoptosis in pancreatic tissues during acute necrotizing pancreatitis. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 498,1 (2018): 79-85. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.026.

MANIGRASSO, M. B.; O'CONNOR, J. P. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. **Acta Orthop.**, v. 81,6 (2010): 748-55. doi:10.3109/17453674.2010.533931.

MARTEL-PELLETIER, J. *et al.* 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.**, v. 50,12 (2004): 3925-33. doi:10.1002/art.20632.

MERCATALI, L. *et al.* RANK/RANK-L/OPG in patients with bone metastases treated with anticancer agents and zoledronic acid: a prospective study. **Int J Mol Sci.**, v. 14,6 10683-93. 23 May. 2013, doi:10.3390/ijms140610683.

PAZIANAS, M. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. **J Natl Cancer Inst.**, v. 103,3 (2011): 232-40. doi:10.1093/jnci/djq516.

RAUNER, M.; SIPOS, W.; PIETSCHMANN, P. Osteoimmunology. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 143,1 (2007): 31-48. doi:10.1159/000098223.

RODAN, G. A.; FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **J Clin Invest.**, v. 97,12 (1996): 2692-6. doi:10.1172/JCI118722.

ROGERS, M. J. *et al.* Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone.**, v. 49,1 (2011): 34-41. doi:10.1016/j.bone.2010.11.008.

RUSELL, R. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone.**, v. 49,1 (2011): 2-19. doi:10.1016/j.bone.2011.04.022.

SHAW, A. T.; GRAVALLESE, E. M. Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 49 (2016): 2-10. doi:10.1016/j.semcdb.2015.10.013.

TAKAYANAGI, H. Interaction between the immune system and bone metabolism: an emerging field of osteoimmunology. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.**, v. 83,5 (2007): 136-43. doi:10.2183/pjab.83.136.

ZHANG, Q. *et al.* IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Clin Cancer Res.**, v. 19,12 (2013): 3176-88. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0042.

YOKOMIZO, T. *et al.* A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J Exp Med.**, v. 192,3 (2000): 421-32. doi:10.1084/jem.192.3.421.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sci.**, v. 152 (2016): 244-8. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025.

VIEIRA, A. E. *et al.* Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. **PloS one.**, v. 10,5 e0128021. 29 May. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0128021.

FAVOT, C. L.; FORSTER, C.; GLOGAUER, M. The effect of bisphosphonate therapy on neutrophil function: a potential biomarker. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 42,5 (2013): 619-26. doi:10.1016/j.ijom.2012.12.011.

SCHEPER, M. A. *et al.* Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. **Br J Haematol.**, v. 144,5 (2009): 667-76. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07504.

KUIPER, J. W. P. *et al.* Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. **Br J Phar.**, v. 165,2 (2012): 532-9. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01592.

RÅDMARK, O.; SAMUELSSON, B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. **J Lipid Res.**, v. 50 Suppl,Suppl (2009): S40-5. doi:10.1194/jlr.R800062-JLR200.