

**ANA CAROLYNA BECHER ROSENO**

**Análise comparativa do processo de reparo ósseo  
alveolar em camundongos machos das linhagens  
129Sv/Ev, C57Bl/6J e BALB/c**

**Araçatuba**

**2022**

**ANA CAROLYNA BECHER ROSENO**

**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 apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Claudia Cristina Bigueti

**Araçatuba**

**2022**

Dedico o presente trabalho a todas as pessoas com as quais compartilhei esta caminhada. À minha família que foi suporte, aos meus amigos que foram aliciente, aos meus professores que foram inspiração e aos meus pacientes que foram motivação.

## **AGRADECIMENTOS**

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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2020/03330-5, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

A Deus, pelo dom da vida e por ter feito dela imensamente prazerosa de ser vivida. E à Nossa Senhora Aparecida pela intercessão diária, zelo e cuidado.

Aos meus pais, Edson Pedroso e Adryana Becher, que sempre acreditaram em meus sonhos e fizeram o possível e impossível para que eles se tornassem realidade. Este é um deles, e é por vocês.

À minha irmã, Giovanna Becher, que é o meu alicerce e o motivo pelo qual eu almejo ser uma pessoa melhor todos os dias.

Ao meu namorado, Schumaker Fioravante, que é meu porto seguro e exemplo de bondade, amor e entrega.

A todos os professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba por dedicarem todo seu amor à docência. Em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariza Akemi Matsumoto que me acolheu como filha e ensinou não só sobre pesquisa científica, mas sobre humildade, humanidade, paciência e fé. E ao Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida que, desde nosso primeiro contato, acreditou no meu potencial e me inspirou a seguir seus passos.

Às mulheres, cirurgiãs, pesquisadoras e professoras, as quais admiro e me inspiro e que tenho a honra de comporem a banca examinadora deste trabalho, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Helena Theodoro e futura doutora Nataira Regina Momesso.

À Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Bigueti, minha referência na área científica, pela paciência em me ensinar e pela excelência com que executa tudo que lhe é proposto.

Ao meu grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Básicas: André Oliva, Ana Carolina Bacelar, Ana Júlia Moreno, Gustavo Simionato, Juliana Aguiar, Mariana Estochi, Samyra Dote, Nataira Momesso, Ramez Mahmoud, Danilo Masocatto, Raquel Parra e Kim Henderson, por todo apoio e amizade construída.

Ao Renan Hajime Yano, que junto com Dolly e Hope Maria foram a minha família em Araçatuba.

Ao meu quinteto, Arthur Viotto, Filipe Melchert, Juliana Aguiar e Vitor Dourado, por toda amizade e apoio.

Aos demais amigos que fizeram a jornada acadêmica ser imensamente prazerosa, em especial, Giovanna Nogueira, Victoria Glaeser, Bruno Marques, Cauê Paizan, Laura Peres, Gustavo Schiavetti, Emanuely Lemos, Ritipael Soares e Samyra Dote.

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas, ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”*

***Carl Jung***

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

## RESUMO

O uso de pequenos roedores em estudos para investigação de eventos aplicados à saúde humana já se encontra estabelecido, principalmente com o auxílio dos camundongos. A variedade de linhagens disponíveis nos permite selecionar o animal adequado para determinado alvo de estudo. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o processo de reparo ósseo alveolar de três linhagens de camundongos, 129Sv/Ev, C57Bl/6J e BALB/c, devido às diferenças na capacidade de resposta inflamatória. Para tanto, foram utilizados 60 camundongos (n=20 para cada linhagem) machos, com idade de 12 semanas, os quais foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito. Após 7 e 30 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e suas maxilas com os alvéolos em reparação removidas para análises histopatológica descritiva e histomorfométrica, imuno-histoquímica e análise de birrefringência. Apesar da reparação satisfatória de todos os alvéolos, a histomorfometria revelou um aumento significativo de matriz óssea nos animais 129Sv/Ev após 30 dias, comparando-se com os C57Bl/6J e BALB/c. A imunomarcagem para TGF- $\beta$  revelou-se aumentada nos animais C57Bl/6J e BALB/c aos 7 dias em relação ao 129Sv/Ev. De modo geral, o grupo C57Bl/6J revelou aumento significativo do número de células iNOS+. No entanto, considerando-se os leucócitos positivos, os BALB/c apresentaram maior número destas células ao final do reparo. Com relação ao TRAP, observou-se maior número de células positivas nos animais 129Sv/Ev em relação aos BALB/c aos 7 dias. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos com relação aos anticorpos RANKL, RUNX-2 e COX-2. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que há diferenças no perfil inflamatório durante o curso de reparo intramembranoso alveolar entre as linhagens de camundongos estudadas que interferem tanto na resposta inflamatória esperada do modelo experimental, assim como na quantidade, porém, não na qualidade da matriz óssea formada no final do reparo.

**Palavras-chave:** Camundongos. Inflamação. Modelo animal. Reparo alveolar.

ROSENO, A. C. B. **Comparative analysis of the dental socket repair of 129Sv/Ev, C57Bl/6J and BALB/c male mice.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

## **ABSTRACT**

The use of small rodents for the investigation of the events correlated with human health is already established, especially when it comes on mice. The variety of available strain enables us to choose the adequate animal model for a specific research theme. Thus, the present study aimed to characterize the dental socket healing process of three different mice breeds, 129Sv/Ev, C57Bl/6J, and BALB/c, considering their differences in inflammatory response. Sixty male mice were used (n=20 for each breed), 12 weeks old, and underwent tooth extraction procedure for the removal of the upper right incisor. After 7, and 30 days post-operative, they were euthanized and their maxillae with the healing sockets were removed for histology, histomorphometry, immunohistochemistry, and birefringence analysis. Besides the satisfactory repair of all dental sockets, histomorphometry revealed a significant increase of bone matrix in the 129Sv/Ev after 30 days, when compared with C57Bl/6J and BALB/c. Immunolabeling for TGF-B was increased in the C57Bl/6J and BALB/c mice at day 7, in comparison to the 129Sv/Ev. In general, C57Bl/6J revealed increased number of iNOS+ cells. However, considering the iNOS+ leukocytes, BALB/c presented the higher number of these cells at the end of the healing process. As for TRAP, higher number of positive cells was observed in 129Sv/Ev when compared with BALB/c at day 7. No significant differences were detected among the groups considering RANKL, RUNX-2, and COX-2. Birefringence analysis did not revealed significant difference among the groups, as well. From these results, it was concluded that there are differences considering the inflammatory profile among the breeds, during the intramembranous socket healing, which interfere in the inflammatory response of the experimental model, as well as in its intensity, but not in the quality of the bone matrix at the end of the healing process.

**Key words:** Mice. Inflammation. Animal model. Alveolar repair.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise qualitativa do grupo 129Sv/Ev para período de 7 dias.....	20
Figura 2 - Análise qualitativa do grupo C57Bl/6J para período de 7 dias.....	21
Figura 3 - Análise qualitativa do grupo C57Bl/6J para período de 7 dias.....	21
Figura 4 - Análise qualitativa do grupo 129Sv/Ev para período de 30 dias .....	22
Figura 5 - Análise qualitativa do grupo C57Bl/6J para período de 30 dias.....	23
Figura 6 – Análise qualitativa do grupo BALB/c para período de 30 dias.....	23
Figura 7 - Representação gráfica da análise quantitativa dos parâmetros histológicos.....	25
Figura 8 - Análise quantitativa do infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares.....	26
Figura 9 - Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo TGF- $\beta$ .....	28
Figura 10 - Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo iNOS.....	29
Figura 11 - Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo RUNX-2.....	30
Figura 12 - Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo RANK-L.....	31
Figura 13 - Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo COX-2.....	32
Figura 14 – Análise quantitativa de marcadores imuno-histoquímicos (TGF- $\beta$ e iNOS).....	33
Figura 15 - Análise quantitativa de marcadores imuno-histoquímicos (RUNX-2, RANK-L, COX- 2 e TRAP).....	33
Figura 16 - Porcentagens das fibras colágenas.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da análise quantitativa dos parâmetros histológicos dos alvéolos em reparação nos diferentes grupos e períodos.....	25
Tabela 2 - Média e desvio padrão da análise quantitativa dos leucócitos mononucleares (MNs) e polimorfonucleares (PMNs) nos diferentes grupos e períodos.....	26
Tabela 3 - Média e desvio padrão da análise quantitativa das células imunomarcadas pelos anticorpos TGF- $\beta$ , iNOS, RUNX2, RANK-L; COX-2 e TRAP.....	34
Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores obtidos a partir da quantificação das fibras colágenas considerando-se os espectros verde e vermelho, bem como as fibras totais.....	35

## LISTA DE SIGLAS

BMPS	Proteínas ósseas morfogenéticas
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EM	Espaço medular
F	Fibroblastos
HE	Hematoxilina e eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
IIN	Infiltrado inflamatório neutrofílico
IL-1	Interleucina 1
LV	Lacunas vazias de osteócitos
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MN	Leucócitos mononucleares
MO	Matriz óssea
OCN	Osteocalcina
OT	Osteócitos
PBS	Phosphate buffer solution
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PVPI	Polivinilpirrolidona
PX	Células psdeudoxantamatosas
TLRS	Toll-like receptors
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
VS	Vasos sanguíneos

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	6
2	PROPOSIÇÃO .....	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1	Modelo experimental .....	15
3.2	Procedimento cirúrgico .....	15
3.3	Coleta das amostras .....	16
3.4	Procedimento histotécnico .....	16
3.5	Análise histológica qualitativa .....	16
3.6	Análise histológica quantitativa.....	16
3.7	Técnica imuno-histoquímica .....	17
3.8	Procedimento histotécnico para análise de birrefringência .....	17
3.9	Análise estatística e disseminação dos resultados .....	18
4	RESULTADOS .....	20
4.1	Análise qualitativa .....	20
4.2	Análise quantitativa .....	23
4.2.1	Lâminas coradas com hematoxilina e eosina .....	23
4.2.2	Lâminas submetidas à técnica de imuno-histoquímica .....	26
5	DISCUSSÃO.....	36
6	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	43
	ANEXO	

# 1 Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes que formam o esqueleto, apresentando as funções de suporte, proteção, locomoção, bem como reserva de constituintes minerais (cálcio, fosfato e outros íons). Esta capacidade multifuncional relaciona-se diretamente com as características da sua matriz mineralizada, cuja integridade é mantida pela atividade coordenada de células ósseas especializadas – osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os osteoblastos são células ósseas mononucleadas de origem mesenquimal (CERRI, 2005), que revestem a superfície da matriz óssea e apresentam como funções: secretar a matriz óssea orgânica, regular sua biomineralização, o recrutamento, diferenciação e ativação dos osteoclastos. No final da fase de formação óssea, os osteoblastos podem passar a um estado quiescente e permanecerem na superfície da matriz como células de revestimento, ou sofrem apoptose, ou mesmo serem incorporados à matriz como osteócitos (MANOLAGAS, 2000; DALLAS, BONEWALD, 2010; BIANCO, SACCHETTI, RIMINUCCI, 2011).

Seguindo a caracterização das células ósseas, temos os osteócitos, que são células de morfologia elíptica e que possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos, situados no interior de pequenos canais denominados canalículos ósseos (COLOPY, 2004). São considerados células bastante versáteis que podem regular a mineralização da matriz logo após a sua incorporação na mesma, e quando totalmente diferenciados, remodelar a matriz perilacunar, captar estímulos mecanosensoriais e coordenar processos de remodelação óssea por meio de sinais bioquímicos e moleculares transmitidos a osteoblastos e osteoclastos (ERIKSEN, 2010; DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013).

Os osteoclastos, por sua vez, são células gigantes, de origem hematopoiética, derivadas de progenitores da linhagem de macrófagos e responsáveis pela reabsorção óssea (GARTNER; HIATT, 2007). Diferente dos osteoblastos que são células formadoras da matriz óssea, os osteoclastos

apresentam como função principal a reabsorção do tecido ósseo, o que é alcançado a partir de sua capacidade de secreção de ácido (íons H<sup>+</sup>), colagenase e outras enzimas que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio (GARLET., et al. 2006).

A matriz óssea é constituída por uma porção orgânica e inorgânica. O colágeno tipo I é responsável por compor 90% da porção orgânica, e os outros 10% é composto por uma grande quantidade de proteínas não-colagenosas, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), osteocalcina (OCN), osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e proteoglicanas. Essas proteínas de caráter não colagenoso são responsáveis pela maturação e mineralização da matriz e podem atuar na regulação da atividade funcional das células ósseas (VIEIRA, 2013). Já a parte inorgânica da matriz óssea é composta pelos cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) depositados nas fibrilas colágenas (TSIRIDIS et al., 2005; HADJIDAKIS, ANDROULAKIS, 2006).

Apresentando as mesmas características morfológicas, composição celular e aspectos moleculares, o tecido ósseo de maior importância aos estudos da área odontológica, é o tecido ósseo alveolar. O osso alveolar é uma estrutura de suporte dos dentes e que se desenvolve em conjunto com o processo de erupção. Entre os tecidos ósseos especializados, o osso alveolar é caracterizado por suas peculiaridades, tais como: a remodelação contínua respondendo rapidamente aos estímulos fornecidos pelos dentes e forças relacionadas, e o constante desafio microbiano característico do ambiente bucal (VIEIRA, 2013).

O osso é um dos poucos órgãos que possui alto grau de regeneração ainda na fase adulta, devido a sua capacidade de remodelação. Mesmo na cavidade oral, o tecido ósseo está em constante renovação. No caso de uma extração dentária, o reparo ósseo alveolar envolve processo complexo e sequenciado que engloba diversas células e tecidos, de forma que a região onde havia o dente fique preenchida com tecido ósseo (TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; LIN et al., 2011; VIEIRA, 2013; BIGUETTI, 2014). Diante de uma lesão tecidual, ocorre uma resposta inflamatória e imune com a finalidade de restaurar a homeostase alterada, o que indica

um papel fundamental das células e fatores do sistema imunológico no processo de reparo.

Em condições homeostáticas de reparo, ocorre a instalação de um processo inflamatório moderado e transitório, que diminui à medida que o processo de reparo progride com a formação de um tecido de granulação, diferenciação de células ósseas e produção de matriz mineralizada, resultando na completa neoformação óssea (CARDOSO et al., 2010; VIEIRA, 2013; BIGUETTI, 2014). Mesmo em condições consideradas não-infecciosas, mecanismos inflamatórios são extremamente importantes no processo de reparo ósseo, e acredita-se que esses mecanismos atuem de forma decisiva no processo de angiogênese, formação e remoção do tecido de granulação e na subsequente formação do tecido ósseo (CARANO; FILVAROFF, 2003; CARDOSO, 2009; KANCZLER; OREFFO, 2008; KANYAMA et al., 2003; POLETI, 2009; RODRIGUES, 2007).

Sabe-se, portanto, que após uma lesão, será desencadeada uma complexa série de processos estritamente organizados e concomitantes, de modo temporário, com o objetivo de restaurar a integridade do tecido envolvido (MILORO, 2008). Dessa forma, o processo de cicatrização de um tecido pode ser dividido em três fases distintas e simultâneas: inflamatória, proliferativa e remodelação (CLARK, 1993; STEED, 2003).

Os acontecimentos imediatos à exodontia são deflagrados na fase denominada inflamatória. Instantaneamente após o ato cirúrgico ocorre a vasoconstrição, com o objetivo de reduzir a perda sanguínea (MILORO, 2008). Neste momento, haverá a ativação do fator de Hageman (fator XII), o qual iniciará a cascata do processo de cicatrização, e também iniciará o evento decisivo para o adequado reparo no defeito ósseo, a agregação plaquetária, processo que resultará no estabelecimento do coágulo sanguíneo. Fisiologicamente, o coágulo organizado serve como arcabouço provisório para invasão de células constitutivas, leucócitos e novos capilares sanguíneos, e também contribui para a liberação de diversos fatores de crescimento e citocinas, oriundos de plaquetas ativadas, o que facilita o estabelecimento do tecido de granulação e do processo inflamatório (NURDEN, 2011; BURNOUF et al., 2013). Posteriormente à hemostasia, a vasoconstrição será

substituída por uma vasodilatação e haverá, também, neste momento, o aumento da permeabilidade vascular, evento, o qual, permitirá que o plasma sanguíneo e outros mediadores celulares de cicatrização atravessem as paredes do vaso e ocupem o espaço extravascular. Nesta fase, acontecerá a liberação de citocinas responsáveis pela produção de sinais quimiotáticos que recrutarão, de modo sequencial, neutrófilos e monócitos para o local da lesão. As citocinas liberadas pelos neutrófilos (fator de necrose tumoral – TNF- $\alpha$  – e interleucinas) estimularão a resposta inflamatória (WERNER, 2003).

As citocinas e os fatores de crescimento que foram secretados na fase inflamatória estimularão as fases de proliferação posteriormente a ela (NIESLER, FERGUSON, 2001). Esta fase é caracterizada pela formação de tecido granulação com células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos em franco desenvolvimento sobre uma matriz frouxa. Os fibroblastos começarão a sintetizar uma nova matriz extracelular e colágenos imaturos do tipo III, formando um arcabouço de fibras colágenas que servirão de suporte aos novos vasos sanguíneos formados, estes, os quais, garantirão o suprimento sanguíneo da lesão (MILORO, 2008).

A fase de proliferação será substituída progressivamente por um período de remodelação e mineralização do tecido cicatricial imaturo. Após a diminuição da demanda metabólica da lesão, a alta rede de capilares começa a regredir. Por ação de citocinas e fatores de crescimento, ocorre a degradação da matriz de colágeno, que será ressintetizada, reorganizada e estabilizada por meio de ligação molecular cruzada. Este tecido de granulação é eventualmente substituído por tecido ósseo recém-formado e, finalmente, por osso lamelar e medula óssea, em maior grau de mineralização (LIN et al., 2011). Existe, em nível molecular, fatores que determinarão a osteogênese deste tecido de granulação, como a expressão das BMPs (FRASNCESCHI, 2005).

Diversos estudos demonstram que o controle do metabolismo ósseo é influenciado por fatores locais e sistêmicos, com destaque para a recente associação do sistema imunológico com o sistema esquelético, área que foi denominada osteoimunologia. (BEHL et al., 2008; DATTA et al., 2008; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; LORENZO; HOROWITZ; CHOI, 2008; RAUNER; SIPOS;

PIETSCHMANN, 2007; TAKAYANAGI, 2005). Diante deste fator, torna-se imprescindível novas pesquisas que visem estabelecer esta íntima relação do processo de reparo ósseo, em região de alvéolo dentário, com o perfil inflamatório estabelecido no organismo em questão.

Mais importante que saber a relação do processo de reparo com a resposta inflamatória, é entender que seres vivos de uma mesma espécie podem apresentar respostas, com características, em nível celular e molecular, diferentes. E é embasado nesta perspectiva, que se julga importante, à comunidade científica, o estabelecimento de uma análise comparativa da resposta inflamatória nos modelos experimentais mais utilizados por ela: os camundongos. Estes são os animais de escolha na maioria dos estudos com objetivo de se analisar o processo de reparo ósseo alveolar, tornando-se, portanto, imprescindível determinar, com precisão, o perfil inflamatório e se ele difere entre as linhagens mais conhecidas destes modelos.

No que concerne à odontologia, a sua utilização muito contribui para o entendimento como um todo deste segmento, com investigações que vão desde os estudos acerca da biocompatibilidade de materiais até a interferência de condições sistêmicas específicas nos processos de reparação tecidual. Em meio às várias espécies que podem ser utilizadas nos experimentos de cunho científico, os pequenos roedores são os mais utilizados pelo seu fácil manuseio, alta performance reprodutiva, baixo custo e por apresentarem-se anatômica e fisiologicamente semelhantes à espécie humana (FOSTER et al., 1982). Deste modo, destacam-se os camundongos que, historicamente tem contribuído de maneira importante para o progresso da saúde, uma vez que estes desenvolvem basicamente as mesmas patologias que os humanos com as mesmas susceptibilidades genéticas, encontram-se disponíveis em linhagens distintas, o que confere uma maior possibilidade de aplicações para as várias áreas do conhecimento da saúde, e além disso podem ser manipulados geneticamente.

Para o estudo do reparo do tecido ósseo, especificamente reparo ósseo alveolar, importante tema na odontologia, várias linhagens são utilizadas para este fim. Dentre elas, destacam-se o C57BL/6J (VIEIRA ET AL., 2015; AVIVI-ARBER et al., 2018; BIGUETTI et al., 2018) e em menor frequência, o 129Sv/Ev (BIGUETTI et

al., 2019). Apesar da existência de estudos sobre reparação óssea com animais da linhagem BALB/c (SINGH et al., 2017), a ausência de pesquisas de cunho científico que analisem o processo de reparação óssea alveolar neste modelo confirmam a importância da investigação das características desses indivíduos relacionados ao tema proposto, uma vez que ainda há uma tendência a se realizar análises comparativas entre resultados de metodologias similares, sem se considerar o modelo animal utilizado.

Neste contexto, torna-se interessante realizar estudo descritivo e comparativo entre diferentes linhagens no modelo de exodontia, com o objetivo de chamar a atenção dos pesquisadores que utilizam este modelo da necessidade de se atentar para as linhagens utilizadas a fim de se interpretar os resultados obtidos sob a luz das particularidades de cada uma delas.

## 2 Proposição

## **2 PROPOSIÇÃO**

Analisar e caracterizar o processo de reparo ósseo alveolar após o procedimento cirúrgico de exodontia do incisivo superior direito em camundongos machos de três diferentes linhagens experimentais: 129Sv/Ev, C57Bl/6J e BALB/c.

## *3 Materiais e Métodos*

## **3 Materiais e métodos**

### **3.1 Modelo experimental**

Para a presente pesquisa, foram utilizados 60 camundongos das linhagens C57Bl/6, 129/Sv e BALB/c, machos, com idade entre 12 e 16 semanas, peso médio de 28 gramas (C57Bl/6, 129/Sv) e 40 gramas (BALB/c), para serem divididos em três grupos distintos e analisados em dois períodos experimentais (n=10 por grupo para os períodos de 7 e 30 dias). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água a vontade e ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) sem restrição, com exceção dos três primeiros dias após exodontia, quando a ração foi oferecida triturada ou pastosa. O presente projeto foi encaminhado e aceito pelo comitê de ética em pesquisa em animais da FOA/UNESP, seguindo-se as normas vigentes pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sob protocolo número 443/2020.

### **3.2 Procedimento cirúrgico**

Inicialmente os animais foram submetidos à sedação profunda administrada via intraperitoneal (IP), utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina (75 mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Foi realizada a antissepsia da cavidade bucal com polivinilpirrolidona 1% tópica (PVPI) (Dermoidine® - Gessy Lever Industrial Ltda.) e montagem dos campos cirúrgicos estéreis. O procedimento cirúrgico propriamente dito iniciou-se com a incisão sulcular ao redor do dente incisivo superior direito, com lâmina de bisturi própria para pequenos roedores. Em ato contínuo, foi realizada divulsão da mucosa inserida com auxílio de uma sonda exploradora adaptada, conforme previamente descrito na literatura, a mesma utilizada para luxação e extração propriamente dita (BIGUETTI et al, 2018). Imediatamente após o procedimento cirúrgico, todos os animais foram encaminhados e mantidos em ambiente apropriado até sua completa recuperação. Os animais foram divididos em três grupos distintos de acordo com sua linhagem.

### **3.3 Coleta das amostras**

Após 7 e 30 dias das exodontias, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de sobre dosagem anestésica. Após constatada a morte dos animais, foram removidas as cabeças contendo a maxila com o alvéolo em reparação. As mesmas foram imediatamente imersas em formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por período máximo de 48 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e posteriormente colocadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0 com trocas realizadas duas vezes por semana por cerca de 40 dias aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com navalha.

### **3.4 Procedimentos histotécnicos**

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. Assim, foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), Picrosirius-red e pela técnica imuno-histoquímica (IHQ).

### **3.5 Análise histológica qualitativa**

Todos os alvéolos de todos os grupos foram analisados a partir dos cortes histológicos corados em HE considerando-se a presença de tecido de granulação, tecido ósseo neoformado, leucócitos, células ósseas, fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos.

### **3.6 Análise histológica quantitativa**

Os alvéolos de todos os animais corados em HE e aqueles submetidos à técnica de imuno-histoquímica foram fotografados e registrados em fotomicroscópio com objetiva de 100x, obtendo-se 10 campos de cada um deles. Utilizou-se o software ImageJ (Version 1.51, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) para a confecção de retículo contendo 120 pontos. Nas lâminas coradas em HE, os pontos coincidentes com estruturas e células estabelecidas foram quantificados,

obedecendo-se os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibroblastos, fibras colágenas, osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e matriz óssea. Já nas lâminas referentes à imuno-histoquímica, apenas as células marcadas positivamente para os referidos marcadores foram quantificadas, quando coincidentes aos pontos desta malha de 120 pontos.

### **3.7 Técnica imuno-histoquímica**

Para a determinação dos padrões moleculares da região de reparo ósseo foram selecionados os seguintes alvos: iNOS, TGF- $\beta$ , COX-2, RANKL, RUNX2 e TRAP. Para tanto, cortes de 5  $\mu$ m 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 policlonais acima indicados, em ambiente refrigerado por 1 hora, e lavados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Após isto, os cortes incubados com anticorpos primários anti-rabbit foram incubados com o polímero-HRP (Easy Link One, EasyPath, ImmunobioscienceCorp., EUA) por 10 a 25 minutos, e em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com Hematoxilina de Harris. Os cortes incubados com anticorpos primários anti-goat foram incubados com polímero Immpress/HRP (Vector Labs, Southfield, EUA). Para controle negativo omitiu-se o anticorpo primário. Uma vez realizadas as marcações, as mesmas foram submetidas a análise quantitativa utilizando-se o software ImageJ. Para a quantificação das células positivamente imunomarcadas para cada anticorpo, utilizou-se a mesma metodologia para a quantificação das células e estruturas na análise histomorfométrica citada anteriormente.

### **3.8 Procedimentos histotécnicos para análise de birrefringência**

Os cortes foram corados com Picrosirius-red, capturados e registrados em microscópio de luz polarizada a fim de se avaliar a qualidade e quantidade das fibras colágenas, considerando-se a intensidade de birrefringência da matriz colagenosa utilizando-se o software LAS versão 4.12 (Leica Application Suite). Inicialmente, foram definidos os espectros de cor verde e vermelha, seguindo valores de RGB (red, green, blue), os quais foram padronizados para todas as imagens. Para a quantificação, as

imagens foram binarizadas para cada espectro de cor e a quantidade em pixels<sup>2</sup> de cada cor correspondente a cada campo. A fim de se evitar interferências da cortical óssea das paredes dos alvéolos, as mesmas foram apagadas nas imagens polarizadas utilizando o software Photoshop para que não fossem contabilizadas pelo programa de análise. Posteriormente, foram calculadas as médias dos valores em pixels<sup>2</sup> somente do interior dos alvéolos e as mesmas foram submetidas para análise estatística para cálculo das médias e desvios-padrão de cada grupo em cada período experimental.

### **3.9 Análise estatística e disseminação dos resultados**

Após a obtenção dos dados numéricos, os mesmos foram submetidos ao teste One Way ANOVA seguido de Turkey considerando-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Prism5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).



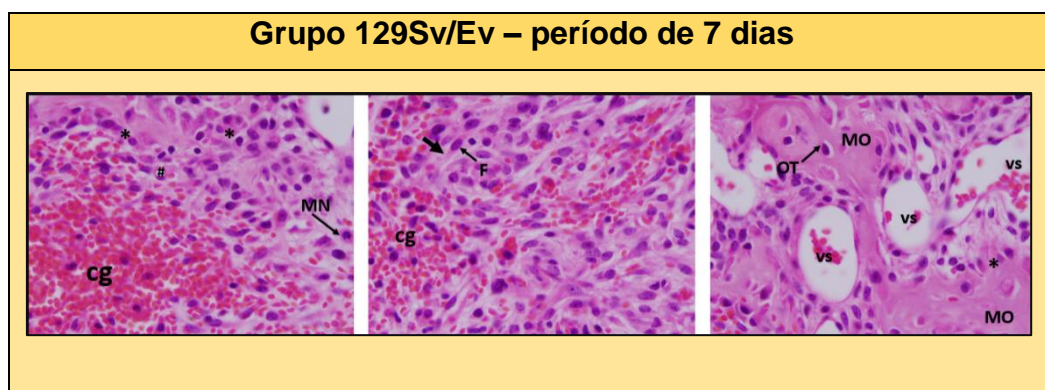
# 4 Resultados

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise qualitativa

Aos 7 dias foi possível observar no interior dos alvéolos dos animais 129Sv/Ev presença de focos de coágulo sanguíneo em meio a tecido de granulação, moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares (MN). Nas regiões próximas às paredes do alvéolo, notou-se a presença de deposição de matriz óssea em organização trabecular (Figura 1). Já os animais C57Bl/6J exibiam os alvéolos preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares e trabéculas primárias (Figura 2). De modo diferente, os camundongos BALB/c apresentaram os alvéolos preenchidos por tecido de granulação intensamente infiltrados por leucócitos polimorfonucleares (PMN) neutrofílico, com eventuais células de aspecto pseudo-xantomatoso. No entanto, também foi possível observar a presença de eventuais trabéculas ósseas primárias (Figura 3).

**Figura 1 – Análise qualitativa do grupo 129Sv/Ev para período de 7 dias**

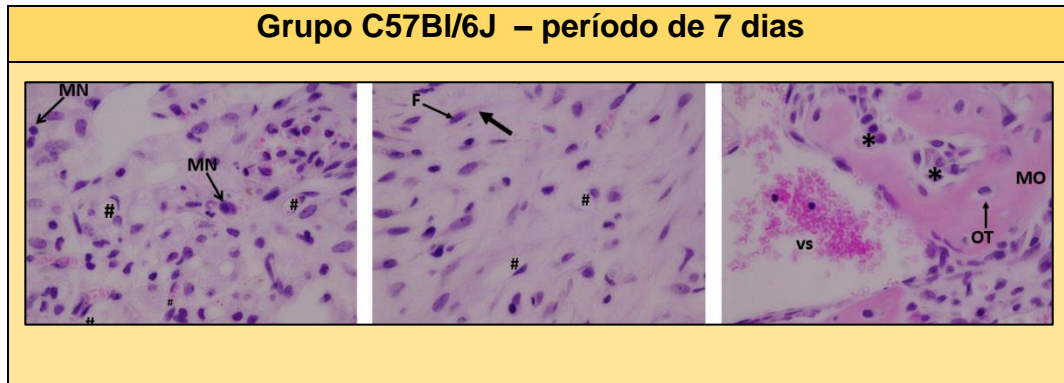


Fonte: Autor, 2022

Observa-se, neste grupo, a presença de coágulo sanguíneo (cg) adjacente a um tecido de granulação, este, por sua vez, composto pela presença e células de caráter mononuclear (MN), fibroblastos (F), fibras colágenas (seta grossa) e angiogênese (#). Na região central do alvéolo, é possível notar a formação de uma

matriz óssea (MO), presença de osteoblastos (\*), osteócitos (OT) e vasos sanguíneos (vs).

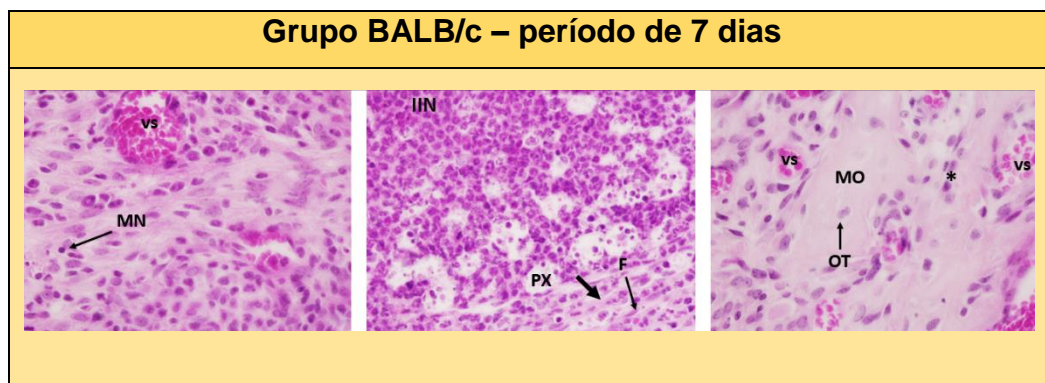
**Figura 2 - Análise qualitativa do grupo C57Bl/6J para período de 7 dias**



Fonte: Autor, 2022

Nota-se, no grupo em questão, a organização de um tecido de granulação constituído por células mononucleares (MN), angiogênese (#), fibroblastos (F) e deposição de fibras colágenas (seta grossa). É possível observar a formação de uma matriz óssea (MO), sendo depositada por osteoblastos (\*) na sua porção central, vê-se a presença de osteócitos (OT) e, lateralmente, vasos sanguíneos (vs)

**Figura 3 - Análise qualitativa do grupo BALB/c para período de 7 dias**



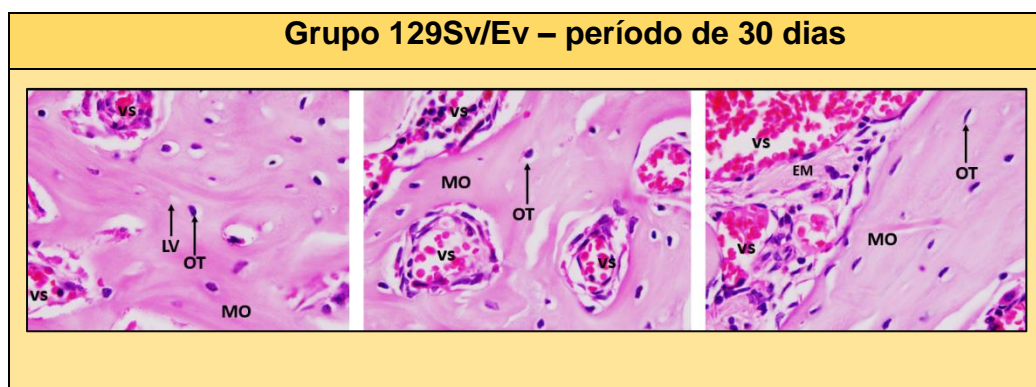
Fonte: Autor, 2022

Já nos animais pertencentes à linhagem BALB/c, é possível observar a presença de um tecido de granulação, presença de células mononucleares (MN), deposição de fibras colágenas (seta grossa) e fibroblastos (F). Nota-se, ainda, a presença de um intenso infiltrado inflamatório neutrofílico (IIN) em meio a células pseudoxantamatosas (PX). Há formação de matriz óssea (MO), osteoblastos (\*) em

sua superfície, osteócitos (OT) em seu interior e vasos sanguíneos (vs) nas proximidades.

De modo geral, aos 30 dias, foi possível notar a formação e organização estrutural do tecido de natureza óssea. Nos animais 129Sv/Ev observou-se o início da maturação da matriz óssea. Em seu interior nota-se a presença de osteócitos em suas respectivas lacunas, e também lacunas vazias. Na superfície dessa estrutura óssea, constata-se a presença de osteoblastos organizados sequencialmente, contribuindo na deposição dessa matriz. Evidenciou-se a presença de vasos sanguíneos bem formados (Figura 4). Nos camundongos C57Bl/6J verificou-se maturação da matriz óssea, representada por sua organização lamelar, contornos regulares e menor quantidade de osteócitos em seu interior. Notou-se a formação dos vasos sanguíneos e a delimitação do espaço medular, no qual observaram-se focos de leucócitos mononucleares (Figura 5). Já nos animais BALB/c, observou-se a presença de infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos em região adjacente à estrutura óssea. Notou-se, também, a maturação da matriz óssea, presença de células de revestimento na superfície e alguns poucos osteócitos na região central desta. Evidenciou-se a formação dos vasos sanguíneos e a região do espaço medular, preenchido por vasos, células sanguíneas e células inflamatórias (Figura 6).

**Figura 4 - Análise qualitativa do grupo 129Sv/Ev para período de 30 dias**

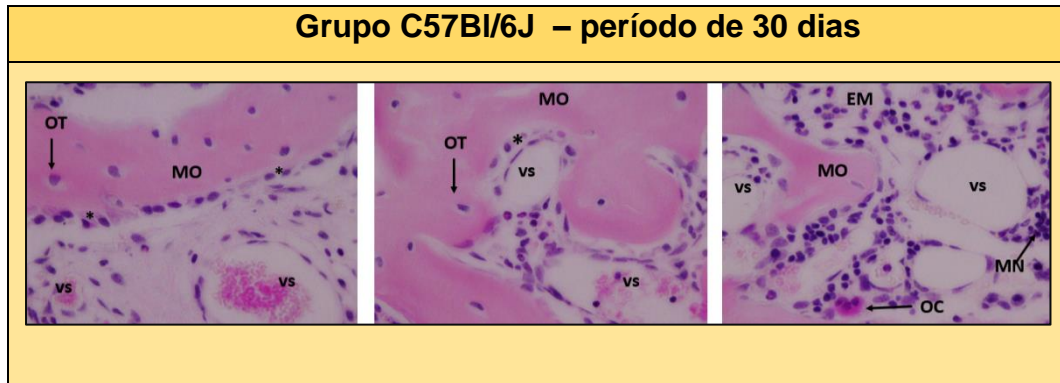


Fonte: Autor, 2022

Nota-se a maturação da matriz óssea (MO), assim como a presença de osteócitos (OT) em suas lacunas e também lacunas vazias de osteócitos

(LV). Observa-se a presença de um espaço medular (EM) e vasos sanguíneos (vs).

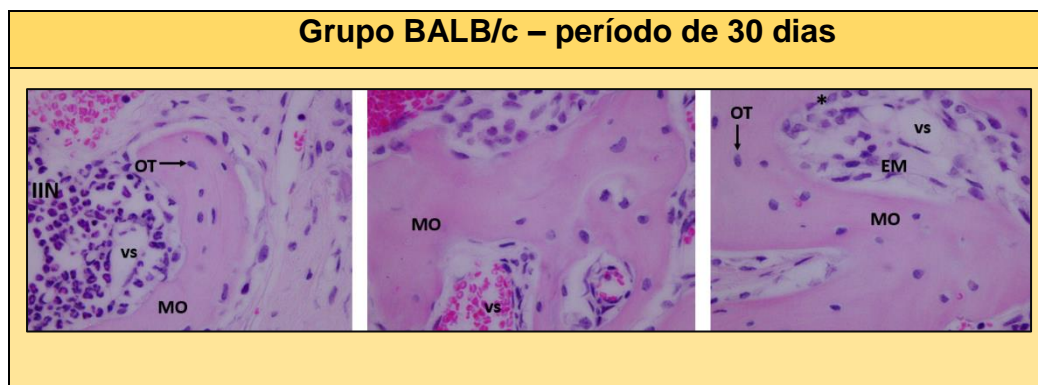
**Figura 5 - Análise qualitativa do grupo C57Bl/6J para período de 30 dias**



Fonte: Autor, 2022

Nas fotomicrografias referentes aos animais C57Bl/6J, é possível observar a estruturação da matriz óssea (MO) com osteoblastos (\*) na superfície e osteócitos (OT) em sua região central. Lateralmente, ao tecido ósseo e no interior do espaço medular (EM) há presença de vasos sanguíneos. Nota-se presença de células inflamatórias mononucleares (MN).

**Figura 6 - Análise qualitativa do grupo BALB/c para período de 30 dias**



Fonte: Autor, 2022

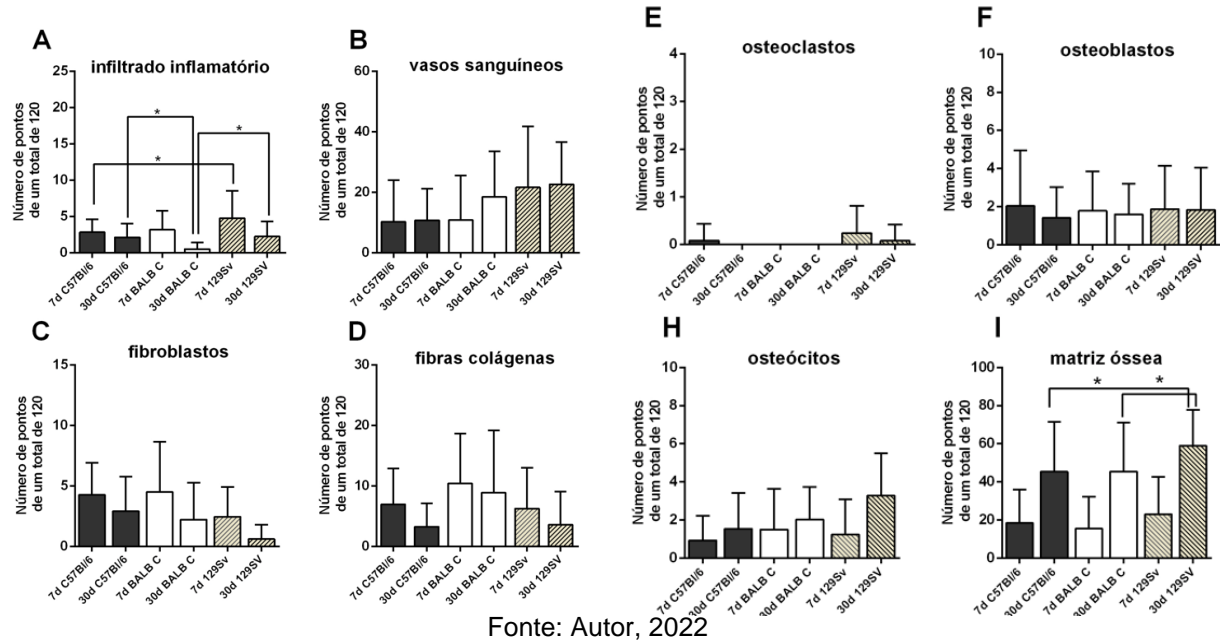
Nos animais BALB/c, é possível observar a presença de um infiltrado inflamatório neutrofílico (IIN) adjacente à matriz óssea (MO). Na região do tecido ósseo, nota-se a presença dos osteoblastos (\*), osteócitos (OT), do espaço medular (EM) e, também, presença de vasos sanguíneos (vs)

## 4.2 Análise Quantitativa

### 4.2.1 Lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina

Os dados obtidos a partir da quantificação dos parâmetros histológicos foram submetidos a teste de normalidade Shapiro Wilk e posteriormente aos testes estatísticos ANOVA seguido de Tukey, considerando-se  $p \leq 0,05$ . Não foram detectadas diferenças significativas entres os grupos considerando-se o mesmo período de avaliação nos parâmetros: vasos sanguíneos, fibroblastos, fibras colágenas, osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. No entanto, foram detectadas diferenças na quantidade de matriz óssea, sendo que aos 30 dias os 129Sv/Ev ( $63.85 \pm 22.03$ ) apresentaram aumento significativo em comparação com os C57Bl/6J ( $40.23 \pm 23.29$ ) e BALB/c ( $38.25 \pm 23.58$ ), conforme pode ser observado na Figura 7 e Tabela 1. Também foi detectada diferença significativa no período inicial do reparo, aos 7 dias, considerando-se o infiltrado inflamatório total nos animais 129Sv/Ev, quando comparado aos C56Bl/6J. Aos 30 dias, os 129Sv ainda apresentavam aumento significativo do número de leucócitos, sendo também detectado aumento significativo nos C56Bl/6J comparando-os aos animais BALB/c. No entanto, quando se analisou os tipos leucocitários, considerando-se MNs e PMNs, observou-se que aos 30 dias os mononucleares mostravam-se em número significativamente maior nos 129Sv/Ev e C56Bl/6J quando comparados com os BALB/c. Não foram detectadas diferenças significativas na quantidade de leucócitos PMNs na comparação entre os grupos e períodos. Estes resultados podem ser observados na Figura 8 e Tabelas 1 e 2.

**Figura 7 – Representação gráfica da análise quantitativa dos parâmetros histológicos**



Para os resultados da análise quantitativa dos parâmetros histológicos comparou-se os grupos dentro do mesmo período de avaliação. As diferenças estatísticas estão indicadas pelo asterisco (\*), considerando-se ( $p \leq 0,05$ ).

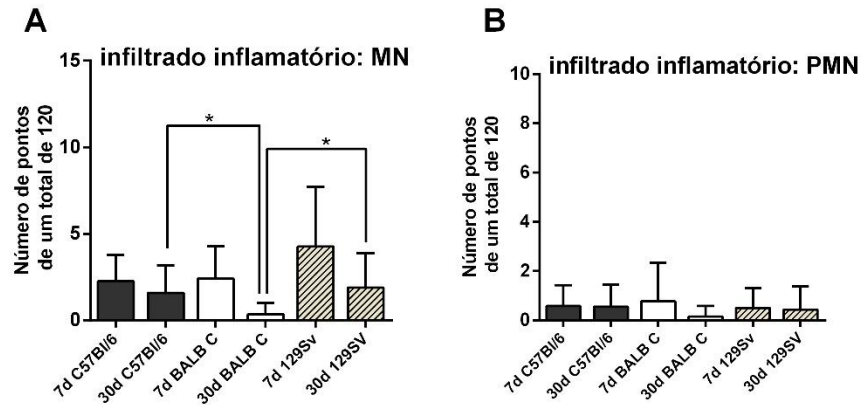
**Tabela 1 – Média e desvio padrão da análise quantitativa dos parâmetros histológicos dos alvéolos em reparação nos diferentes grupos e períodos**

	C57Bl/6J 7d	C57Bl/6J 30d	BALB/c 7d	BALB/c 30d	129Sv/Ev 7d	129Sv/Ev 30d
<b>II</b>	3.396 ± 2.267	1.9 ± 2.061	3.625 ± 2.464	1.5 ± 1.301	3.647 ± 2.893	0.95 ± 1.538
<b>VS</b>	11.96 ± 11.83	14.38 ± 10.69	11.88 ± 11.66	15.53 ± 13.2	15.41 ± 20.46	14.8 ± 13.32
<b>Fb</b>	2.896 ± 2.045	1.325 ± 1.685	2 ± 1.934	1.7 ± 2.003	5.353 ± 2.422	1.15 ± 2.134
<b>FC</b>	6.521 ± 4.217	2.7 ± 3.603	6.208 ± 4.644	4.175 ± 5.43	4.176 ± 2.422	1.5 ± 2.039
<b>OC</b>	0.125 ± 0.3928	0 ± 0	0.04167 ± 0.2041	0.05 ± 0.2207	0.1176 ± 2.298	0.05 ± 0.2236
<b>OB</b>	1.521 ± 2	1.05 ± 1.825	1.542 ± 1.911	1.921 ± 1.549	6.588 ± 4.214	2.85 ± 2.641
<b>Otc</b>	0.25 ± 0.5259	0.6 ± 1.825	0.25 ± 0.5316	0.6251 ± 1.148	0.3529 ± 0.6063	0.6316 ± 0.684
<b>MO</b>	15.81 ± 16.95	40.23 ± 23.29 <sup>a</sup>	13.21 ± 16.76	38.25 ± 23.58 <sup>a</sup>	14.76 ± 10.9	63.85 ± 22.03 <sup>b</sup>

Fonte: Autor, 2022

As letras minúsculas diferentes apontam diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando -se mesmo período ( $p \leq 0,05$ ). Sendo estes representados a partir das siglas: II – infiltrado inflamatório, VS – vasos sanguíneos, Fb – fibroblastos, FC – fibras colágenas, OC – osteoclastos, OB – osteoblastos, Otc – osteócitos, MO – matriz óssea.

**Figura 8 - Análise quantitativa do infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares**



Fonte: Acervo pessoal

Para a realização da análise quantitativa do infiltrado inflamatório considerou-se, individualmente, as células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN). As diferenças significativas estão sinalizadas com asterisco (\*), considerando-se ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2 – Média e desvio padrão da análise quantitativa dos leucócitos mononucleares (MNs) e polimorfonucleares (PMNs) nos diferentes grupos e períodos**

	C57Bl/6J 7d	C57Bl/6J 30d	BALB/c 7d	BALB/c 30d	129Sv/Ev 7d	129Sv/Ev 30d
MNs	2.25 ± 1.523	1.575 ± 1.599	2.409 ± 1.869	0.35 ± 0.6622	4.262 ± 3.443	1.0 ± 1.992
PMNs	0.5833 ± 0.8464	0.55 ± 0.9044 <sup>a</sup>	0.7727 ± 1.572	0.15 ± 0.4267 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.804	0.44 ± 0.951 <sup>a</sup>

Fonte: Autor, 2022

As letras minúsculas diferentes apontam diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando-se o mesmo período ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2 Lâminas submetidas à técnica de imuno-histoquímica

Os dados obtidos a partir da quantificação das células positivamente marcadas pelos anticorpos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e posteriormente aos testes estatísticos ANOVA seguido de Turkey, considerando-se  $p \leq 0,05$ .

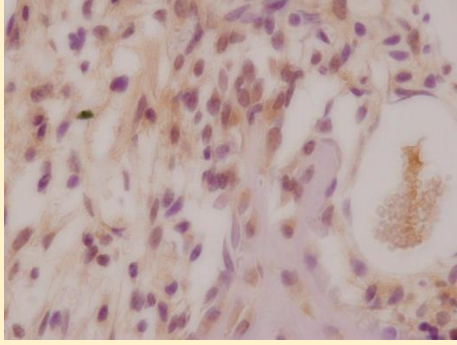
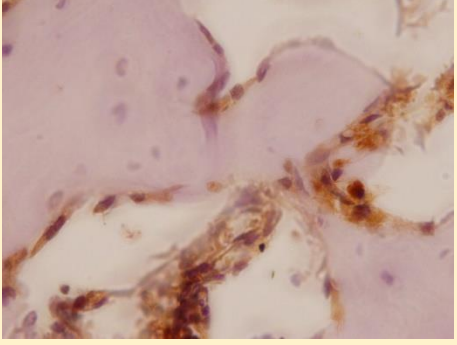
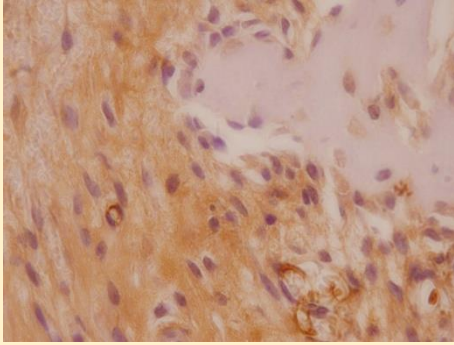
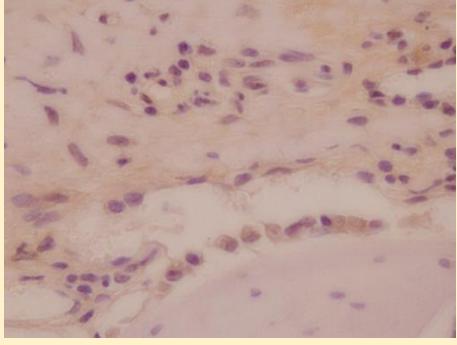
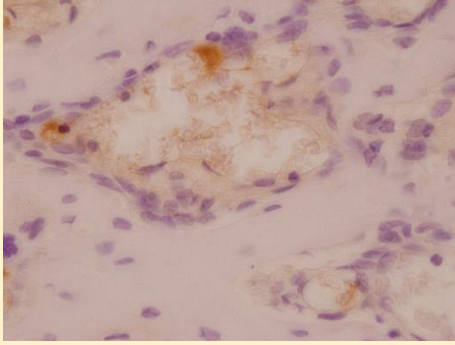
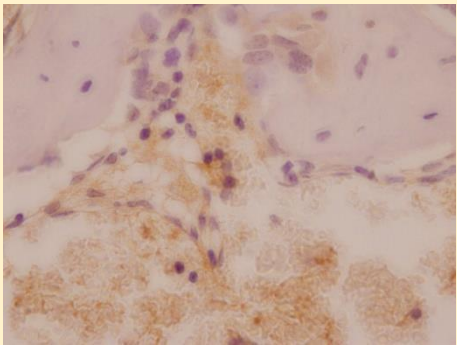
Observou-se aumento significativo de células TGF- $\beta$ + nos grupos C57Bl/6J ( $5.45 \pm 2.892$ ) e BALB/c ( $3.967 \pm 3.873$ ) em comparação com o 129Sv/Ev ( $0.6571 \pm 0.9315$ ), para o período de 7 dias. No entanto, aos 30 dias, o grupo BALB/c

( $3.366 \pm 2.141$ ) apresentou aumento significativo das células TGF- $\beta$ <sup>+</sup> quando comparado ao grupo 129Sv/Ev ( $0.3529 \pm 0.6063$ ).

Com relação às células iNOS<sup>+</sup>, detectou-se aumento significativo nos grupos C57Bl/6J ( $3.591 \pm 3.261$ ) e 129Sv/Ev ( $3.611 \pm 2.304$ ) quando comparado ao grupo BALB/c ( $91 \pm 1.1035$ ) no período de 7 dias. Já aos 30 dias, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, quando se considerou os leucócitos individualmente, detectou-se aumento significativo de iNOS<sup>+</sup> nos animais pertencentes ao grupo BALB/c ( $2.333 \pm 2.279$ ) em comparação com os 129Sv/Ev ( $0.7059 \pm 0.719$ ) no período de 30 dias. Por outro lado, quando realizada a análise da marcação nas células ósseas, detectou-se aumento significativo de células iNOS<sup>+</sup> nas linhagens C57Bl/6J ( $1.727 \pm 2.815$ ) e 129Sv/Ev ( $1.611 \pm 1.754$ ) em comparação aos BALB/c ( $0.0348 \pm 0.1857$ ) no período de 7 dias (Figura 16).

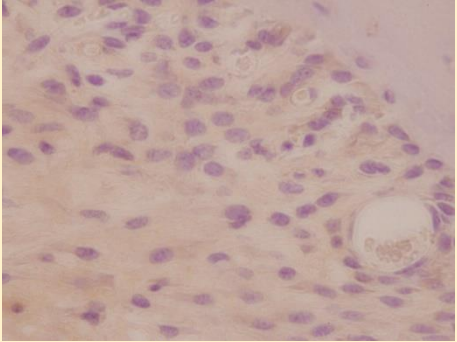
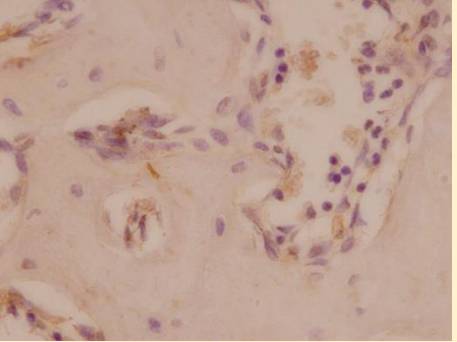
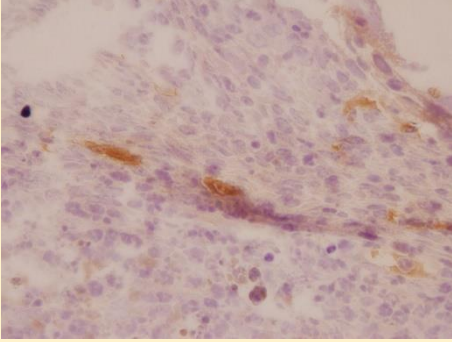
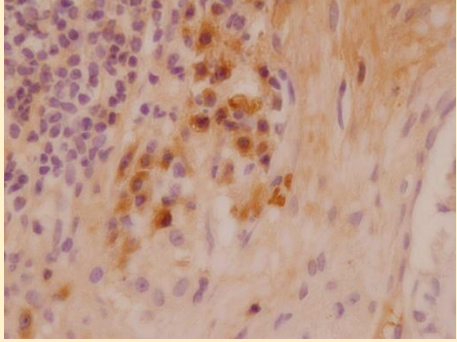
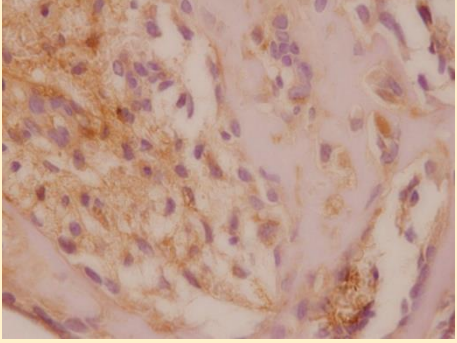
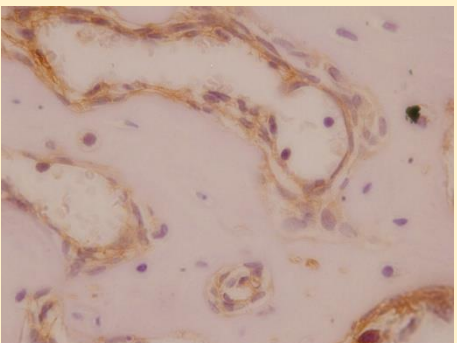
Aos 7 dias, detectou-se aumento significativo de células RUNX-2 no grupo 129Sv/Ev ( $0.84 \pm 1.173$ ) em comparação com BALB/c ( $0.1667 \pm 0.6477$ ). No mesmo período, houve aumento significativo de células TRAP<sup>+</sup> no grupo 129Sv/Ev ( $0.5 \pm 0.6481$ ) em comparação com BALB/c ( $0 \pm 0$ ). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos e períodos considerando-se as marcações para RANKL e COX-2 (Figura 17).

Figura 9 - Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo TGF- $\beta$ 

TGF- $\beta$		
GRUPOS	7 DIAS	30 DIAS
C57Bl/6J		
BALB/c		
129Sv/Ev		

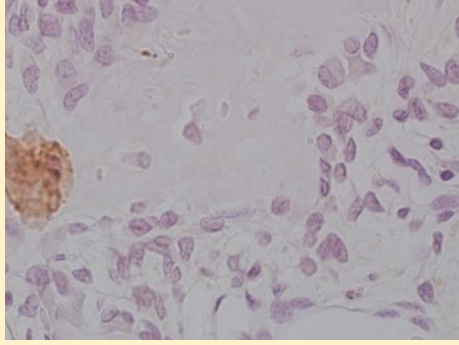
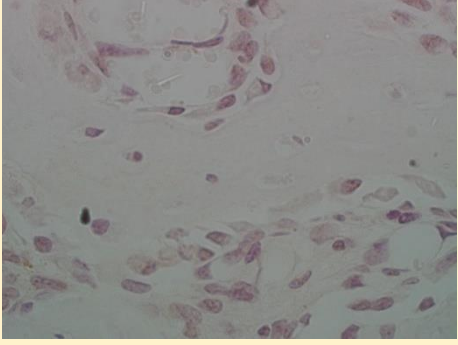
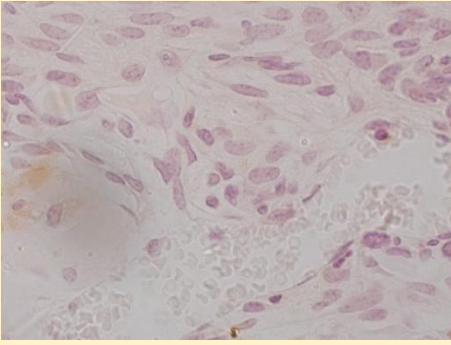
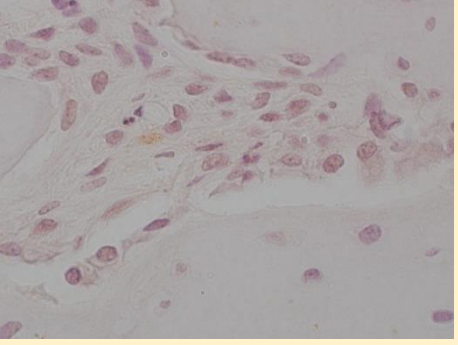
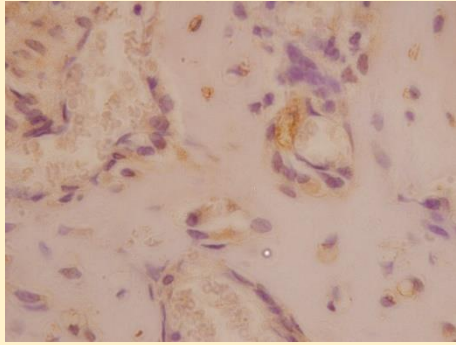
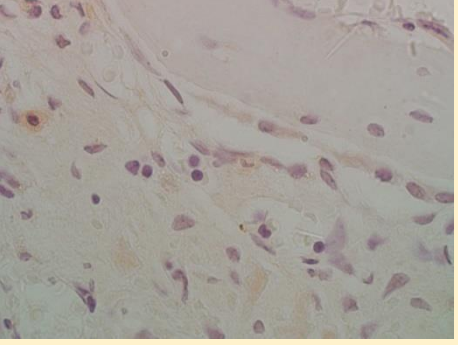
Fonte: Autor, 2022

Figura 10 - Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo iNOS

iNOS		
GRUPOS	7 DIAS	30 DIAS
C57Bl/6J		
BALB/c		
129Sv/Ev		

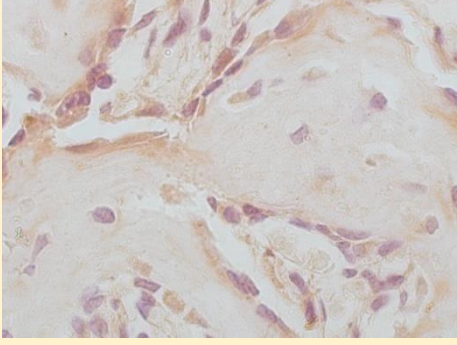
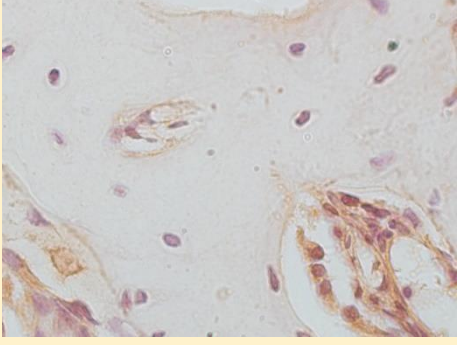
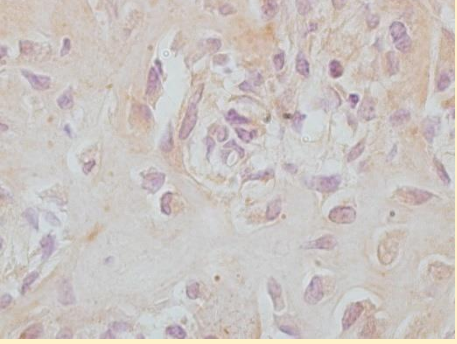
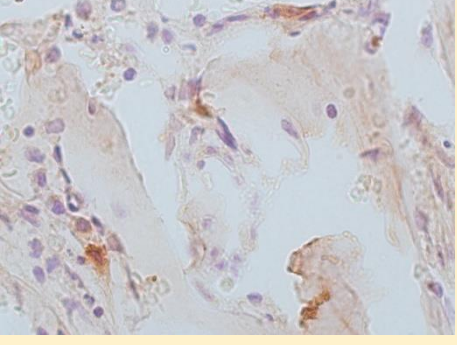
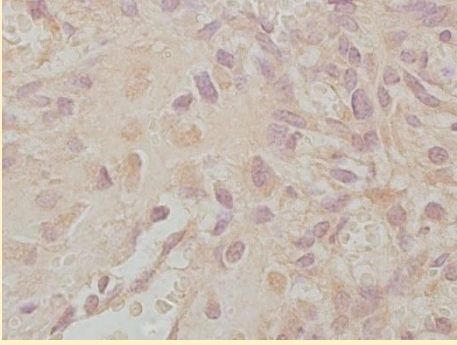
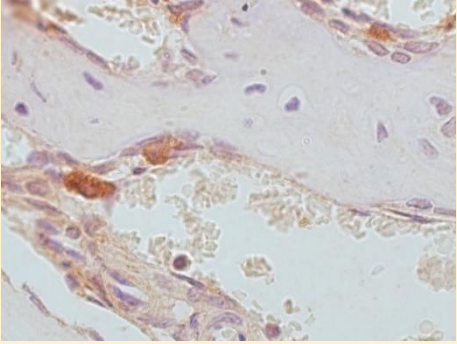
Fonte: Autor, 2022

Figura 11 – Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo RUNX-2

RUNX-2		
GRUPOS	7 DIAS	30 DIAS
C57Bl/6J		
BALB/c		
129Sv/Ev		

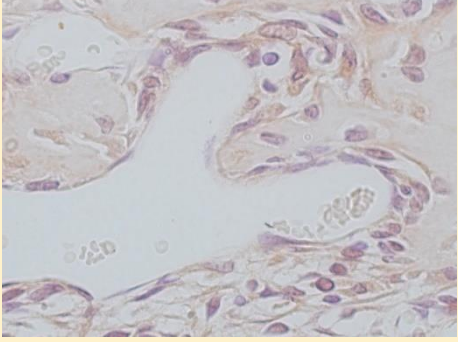
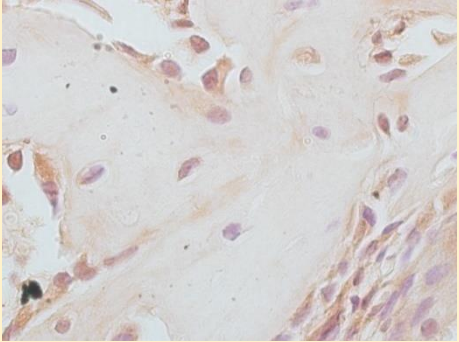
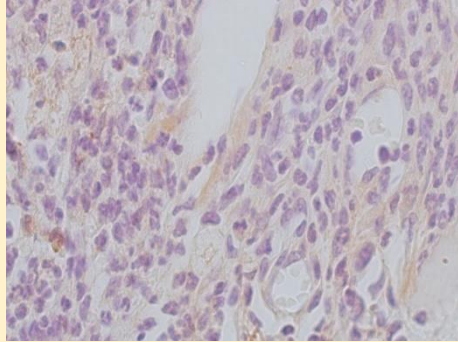
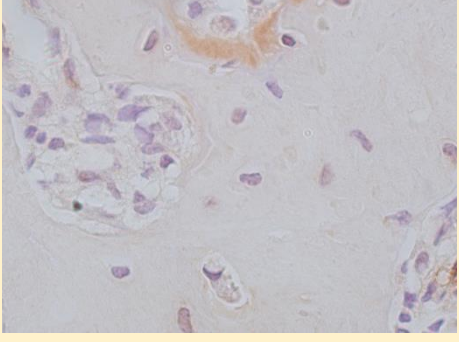
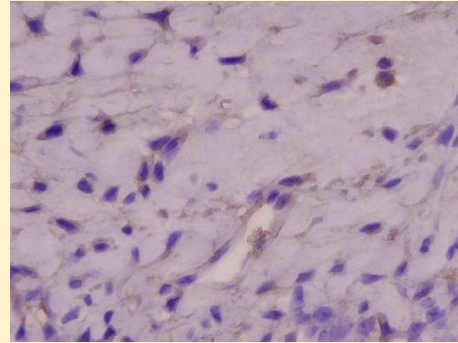
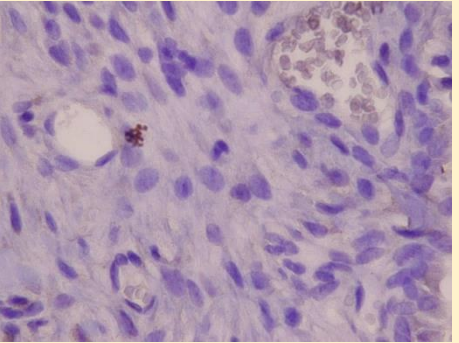
Fonte: Autor, 2022

Figura 12 – Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo RANK-L

RANK-L		
GRUPOS	7 DIAS	30 DIAS
C57Bl/6J		
BALB/c		
129Sv/Ev		

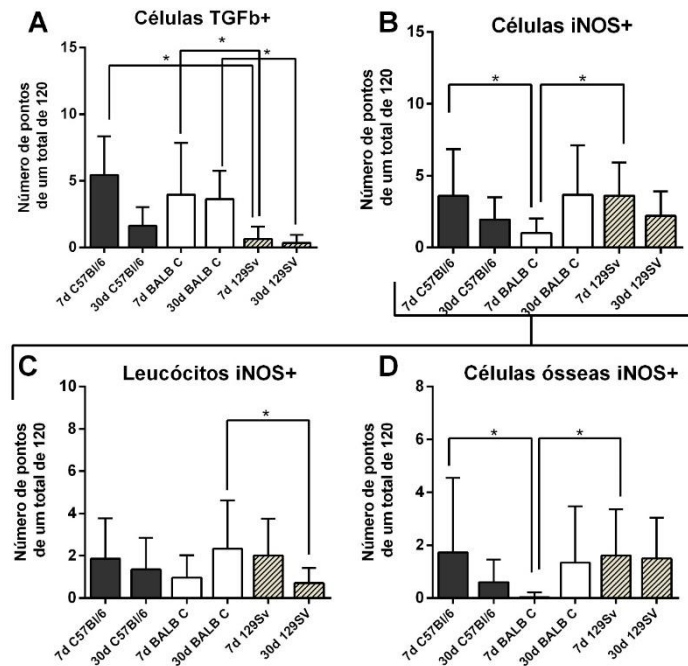
Fonte: Autor, 2022

Figura 13 – Marcação imuno-histoquímica para o anticorpo COX-2

COX-2		
GRUPOS	7 DIAS	30 DIAS
C57Bl/6J		
BALB/c		
129Sv/Ev		

Fonte: Autor, 2022

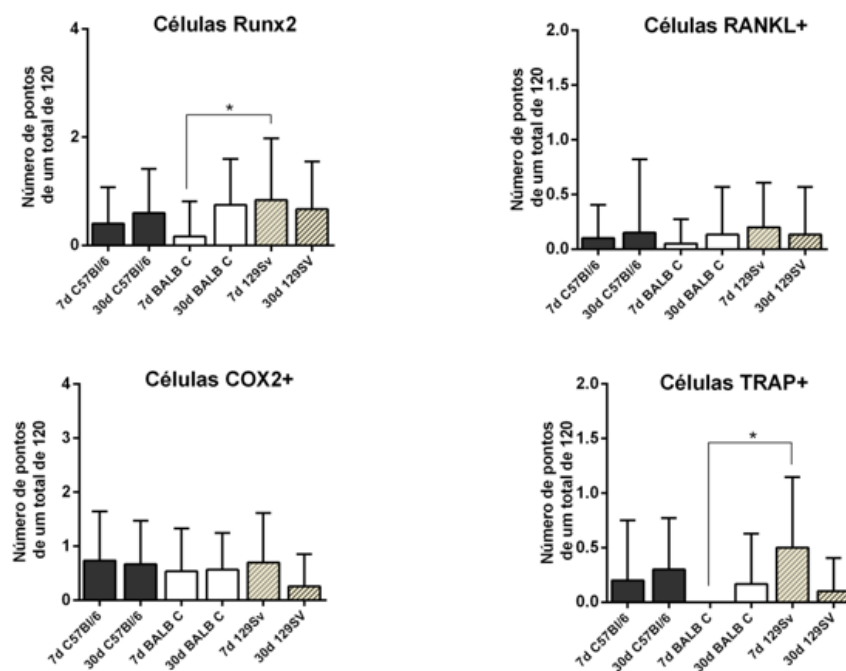
**Figura 14 – Análise quantitativa de marcadores imuno-histoquímicos (TGF- $\beta$  e iNOS)**



Fonte: Autor, 2022

Observa-se na representação gráfica as células marcadas positivamente para os anticorpos: (Gráfico A) – TGF- $\beta$ ; (Gráfico B) – iNOS totais; (Gráfico C) – iNOS em leucócitos; (Gráfico D) – iNOS em células ósseas. As diferenças significativas estão sinalizadas com asterisco (\*), considerando-se  $p \leq 0,05$ .

**Figura 15 – Análise quantitativa de marcadores imuno-histoquímicos (RUNX-2, RANK-L, COX-2 e TRAP)**



Fonte: Autor, 2022

Nesta representação gráfica destaca-se os resultados obtidos a partir da quantificação, por números totais de pontos, das células marcadas para os anticorpos Runx-2, RANKL, COX-2 e TRAP. As diferenças significativas estão sinalizadas com asterisco (\*), considerando-se  $p \leq 0,05$

**Tabela 3 – Média e desvio padrão da análise quantitativa das células imunomarcadas pelos anticorpos TGF- $\beta$ , iNOS, RUNX2, RANK-L; COX-2 e TRAP.**

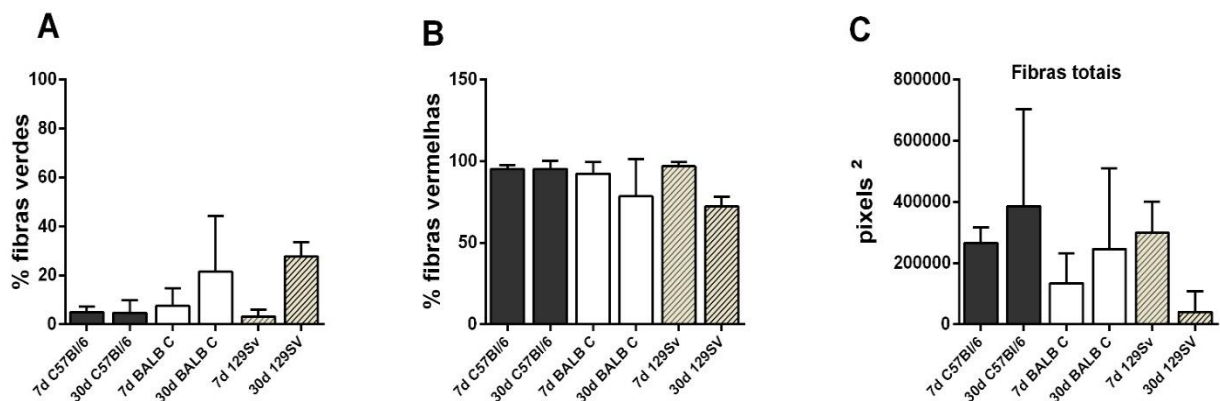
	C57Bl/6J 7d	C57Bl/6J 30d	BALB/c 7d	BALB/c 30d	129Sv/Ev 7d	129Sv/Ev 30d
TGF- $\beta$	5.45 $\pm$ 2.892	1.625 $\pm$ 1.408	3.967 $\pm$ 3.873	3.633 $\pm$ 2.141	0.6571 $\pm$ 0.9315	0.3529 $\pm$ 0.6063
iNOS total	3.591 $\pm$ 3.261	1.95 $\pm$ 1.538	1 $\pm$ 1.035	3.667 $\pm$ 3.447	3.611 $\pm$ 2.304	2.206 $\pm$ 1.684
iNOS Leuc.	1.864 $\pm$ 1.91	1.35 $\pm$ 1.496	0.9655 $\pm$ 1.052	2.333 $\pm$ 2.279	2 $\pm$ 1.749	0.7059 $\pm$ 0.719
iNOS Cél. Ósseas	1.727 $\pm$ 2.815	0.6 $\pm$ 0.855	0.03448 $\pm$ 0.1857	1.333 $\pm$ 2.139	1.611 $\pm$ 1.754	1.5 $\pm$ 1.542
RUNX2	0.4 $\pm$ 0.6747	0.6 $\pm$ 0.8137	0.1667 $\pm$ 0.6477	0.45 $\pm$ 0.8507	0.84 $\pm$ 1.173	0.6667 $\pm$ 0.8841
RANKL	0.1 $\pm$ 0.3051	0.15 $\pm$ 0.6708	0.05 $\pm$ 0.2236	0.1333 $\pm$ 0.4342	0.2 $\pm$ 0.4068	0.1333 $\pm$ 0.4342
COX-2	0.7333 $\pm$ 0.9072	0.6667 $\pm$ 0.8023	0.5357 $\pm$ 0.7927	0.5667 $\pm$ 0.6789	0.7 $\pm$ 0.9154	0.2593 $\pm$ 0.5944
TRAP	0.2 $\pm$ 0.5509	0.3 $\pm$ 0.4702	0 $\pm$ 0	0.1667 $\pm$ 0.4611	05 $\pm$ 0.6481	0.1 $\pm$ 0.3051

Fonte: Autor, 2022

#### 4.2.3 BIRREFRINGÊNCIA

Não foram detectadas diferenças significantes considerando-se as fibras colágenas totais, bem como considerando-se os espectros verde e vermelho, na comparação entre os grupos e períodos.

**Figura 16 – Porcentagens das fibras colágenas considerando-se o espectro verde (A) e vermelho (B) presentes no interior dos alvéolos. (C) – quantidade de fibras colágenas totais**



Fonte: Autor, 2022

**Tabela 4 – Média e desvio padrão dos valores obtidos a partir da quantificação das fibras colágenas considerando-se os espectros verde e vermelho, bem como as fibras totais**

	C57Bl/6J 7d	C57Bl/6J 30d	BALB/c 7d	BALB/c 30d	129Sv/Ev 7d	129Sv/Ev 30d
FIBRAS VERDES	4,864±2,381	4,792±5,035	7,619±7,192	21,54±22,73	3,241±2,845	27,74±5,875
FIBRAS VERMELHAS	95,14±2,381	95,21±5,035	92,38±7,192	78,46±22,73	96,76±2,845	72,26±5,875
FIBRAS TOTAIS	266662±49633	286661±316535	134469±97548	246368±263647	299233±102189	40863±67155

Fonte: Autor, 2022

## **5Discussão**

## 5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se constatar diferenças no processo de reparo intramembranoso de alvéolos dentários pós-exodontia, comparando-se as três linhagens utilizadas no presente estudo, 129Sv/Ev, C57Bl/6J e BALB/c. Atenção especial foi dada ao perfil inflamatório durante este processo e sua relação com o reparo final. Apesar da ausência de trabalhos experimentais comparativos que utilizem este parâmetro de estudo – exodontia – as características imunológicas intrínsecas de cada animal (KORANI et al., 2019), bem como os desafios à resposta (HOOVER-PLOW et al., 2008) já investigados, apontavam para uma provável diferença também no modelo de reparação óssea alveolar.

Importante ressaltar que os alvéolos repararam sem intercorrências, resultando no preenchimento dos mesmos por tecido ósseo maduro em remodelação. No entanto, cada uma das linhagens apresentou perfil inflamatório distinto no curso do reparo. Dentre as linhagens estudadas, os camundongos 129Sv/Ev exibiram infiltrado inflamatório mais exacerbado tanto no período inicial, quanto no período tardio do reparo alveolar. Por outro lado, no período inicial os animais C57Bl/6J mostraram menor quantidade de leucócitos totais, enquanto que após 30 dias os BALB/c exibiram menor infiltrado que os demais grupos.

Quando da análise individual dos tipos leucocitários, mononucleares e polimorfonucleares, as diferenças encontradas no período de 30 dias se referiram aos mononucleares, uma vez que o infiltrado neutrofílico foi bastante discreto em todos os grupos e períodos, confirmando a ausência de contaminação ou outros fatores que pudessem exacerbar ou estender a fase aguda da inflamação. Neste contexto, destaca-se que os macrófagos exercem papel determinante no curso do processo de reparo pós-injúria, uma vez que atuam como sensores em condições de perigo no hospedeiro por possuírem receptores capazes detectar debris de células necróticas, como os Toll-like receptors (TLRs) e para interleucina-1 (IL-1) (YANG et al., 2008).

Assim, possuem a capacidade de alterar sua fisiologia em resposta ao meio em que se encontram (MOSSER & EDWARDS, 2008) e de se polarizarem em macrófagos do tipo1 (M1) ou 2 (M2), com comportamentos pró-inflamatórios e anti-

inflamatórios, respectivamente. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos estimula a produção de TGF- $\beta$ , levando-os ao perfil M2 e liberando citocinas anti-inflamatórias favorecendo o ambiente para a reparação. Além disso, sabe-se do papel essencial deste fator de crescimento no metabolismo do tecido ósseo e nas suas afecções (JANN et al., 2020). O número significativamente reduzido de células TGF- $\beta$  no grupo 129Sv/Ev aos 7 dias mostrou-se coerente com o aumento significativo de infiltrado inflamatório total neste grupo no mesmo período, em relação aos animais C57Bl/6J. Do mesmo modo, os animais BALB/c no período de 30 dias apresentaram número elevado de células TGF- $\beta$ +, enquanto o número de leucócitos encontrava-se significativamente reduzido em relação aos demais grupos. Apesar do conhecido papel do TGF- $\beta$  na diferenciação, proliferação e maturação osteoblástica (WU et al., 2016), este depende dos níveis e do momento de sua secreção (MANZANO-MORENO et al., 2018).

Já foi observado que a proliferação inicial dos osteoblastos ocorre sob níveis baixos a moderados de TGF- $\beta$ 1, porém, estes mesmos níveis inibem a mineralização. Além disso, mostrou-se que sua inibição resulta em aumento de massa e qualidade óssea (MOHAMMAD et al., 2009). Deste modo, a redução na quantidade de matriz óssea ao final do reparo (30 dias) dos animais BALB/c confirmada pela histomorfometria, possivelmente esteja relacionado com os níveis disponíveis de TGF- $\beta$  neste período. De modo contrário, notou-se que a marcação de TGF- $\beta$  nos animais 129Sv/Ev mantiveram-se diminuídas em comparação com os demais grupos nos dois períodos, sendo este o grupo que apresentou aumento significativo de matriz óssea aos 30 dias. De modo coerente, a maior quantidade de células Runx-2+ foi detectada também nos animais 129Sv/Ev aos 7 dias. Sabe-se que a expressão de Runx-2 atinge o seu pico em osteoblastos imaturos, aumentando a proliferação de células osteoprogenitoras e a expressão de genes de proteínas da matriz óssea, diminuindo nos osteoblastos maduros (KOMORI, 2019).

As citocinas pró-inflamatórias tendem a direcionar o perfil dos macrófagos para M1, ativando a via da iNOS. Isto também ocorre nas células ósseas, que tem sua via iNOS ativada quando em condições inflamatórias (LÖWIK et al., 1994). Devido a isto, observou-se a imunomarcagem tanto de leucócitos como de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), e assim optou-se pela contagem individual das células

iNOS+. Considerando a contagem de células totais iNOS+ detectou-se um aumento significativo no grupo C57Bl/6J e 129Sv/Ev em comparação aos BALB/c aos 7 dias pós-exodontia. No entanto, ao considerar os leucócitos iNOS+, observou-se que dentre as três linhagens, os BALB/c apresentavam o maior número de leucócitos que o 129Sv/Ev no período final do reparo, revelando um possível perfil equilibrado em M1 e M2 neste período, o que pode ter levado à menor quantidade de matriz óssea detectada. Este fato se reforça quando se observam as células ósseas iNOS+, mais numerosas nos grupos C57Bl/6J e 129Sv/Ev no período inicial do reparo, porém, sem diferenças aos 30 dias, mas que também pode ter influenciado na quantidade de matriz óssea final. Os demais parâmetros histológicos analisados quantitativamente não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e períodos.

O grupo BALB/c apresentou menor imunomarcagem de Runx-2 e TRAP aos 7 dias em comparação com o 129Sv/Ev, apesar da ausência de diferença significativa na imunomarcagem para RANKL e COX-2 entre os grupos nos dois períodos, os quais estão diretamente relacionados ao processo de osteoclastogênese. O RANK-L é um mediador com ação chave na osteoclastogênese, especificamente na ativação dos osteoclastos (TEITELBAUM et al., 2003), enquanto que, por sua vez, a COX-2 dependente da PGE2 está diretamente envolvida na indução dos precursores de osteoclastos via RANK-L (HAN et al., 2005). Os osteoclastos ativados expressam a TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) que é a enzima que degrada o tecido ósseo e seus constituintes (ZAIDI et al., 1989; MOONGA et al., 1990). Sua marcação em cortes histológicos é realizada para se determinar a presença de osteoclastos ativados e seus precursores (HAYMAN et al., 2001). Possivelmente, a maior expressão de células Runx-2+ e TRAP+ nos períodos iniciais do reparo nos animais 129Sv/Ev poderia ser um indicativo de maturação óssea precoce em comparação com os demais. Apesar destes achados, a qualidade da matriz colagenosa pela coloração com Picosirius-red não revelou diferenças significativas entre os grupos e períodos.

## **6 Conclusão**

## **6 CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que há diferenças no perfil inflamatório durante o curso de reparo intramembranoso alveolar entre as linhagens de camundongos estudadas que interferem tanto na resposta inflamatória esperada do modelo experimental, assim como na quantidade, porém, não na qualidade da matriz óssea formada no final do reparo.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

AVIVI-ARBER, L.; AVIVI, D.; PEREZ, M.; ARBER, N.; SHAPIRA, S. Impaired bone healing at tooth extraction sites in CD24-deficient mice: A pilot study. **Plos one**, v. 13, n. 2, p. e0191665, 2018.

BEHL, Y.; SIQUEIRA, M.; ORTIZ, J.; LI, J.; DESTA, T.; FAIBISH, D. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. **J Immunol**. p. 8711-8718. 2008.

BIANCO, P.; SACCHETTI, B.; RIMINUCCI, M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. p.37-47. 2011.

BIGUETTI, C. C. Papel das células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos: caracterização histomorfométrica e molecular. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2014.

BIGUETTI, C. C.; CAVALLA, F.; SILVEIRA, E. V.; TABANEZ, A. P.; FRANCISCONI, C. F.; TAGA R.; GARLET, G. P. HGMB1 and RAGE as essential components of Ti osseointegration process in mice. **Frontiers in Immunology**. 2019.

BURNOUF, T.; GOUBRAN, H. Á.; CHEN, T. M.; OU, K. L.; EI-EKIABY, M.; RADOSEVIC, M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. **Blood Ver**. p. 77-89. 2013.

CARANO, R. A.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug discovery today**. p.980- 989. 2003.

CARDOSO, C. R. Análise morfométrica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2009.

CARDOSO, C.L.; RODRIGUES, M.T.V.; JÚNIOR, O.F, GARLET, G. P.; DE CARVALHO, P.S.P. Clinical concepts of dry socket. **J Maxillofac Oral Surg**. p. 1922-1932. 2010.

CERRI, PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* p.833-40. 2005.

CLARK, R.A. F. Biology of dermal wound repair. ***Dermatol Clin*** . p.647-66. 1993.

COLOPY, S. A.; BENZ-DEAN, J.; BARRETT, J. G.; SAMPLE, S. J.; LU, Y.; DANOVA, N. A.; MUIR, P. Response of the osteocyte syncytium adjacent to and distant from linear microcracks during adaptation to cyclic fatigue loading. ***Bone***. p.881-891. 2004.

DALLAS, S. L.; PRIDEAUX, M.; BONEWALD, L. F. The osteocyte: an endocrine cell... and more. ***Endocrine reviews***. p. 658-690. 2013.

DATTA, H. K.; NG, W. F.; WALKER, J. Á.; TUCK, S. P.; VARANASI, S. S. The cell biology of bone metabolism. ***J Clin Pathol***. p. 577-587. 2008.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. ***Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders***. p.219-227. 2010.

FOSTER, C. S.; WILSON, L. A.; EKINS, M. B. Immunosuppressive therapy for progressive ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*. p. 340-353. 1982.

FRANCESCHI, R.T.; Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. ***Journal of dental research***. p.1093-1103. 2005.

GARLET, G.; CARDOSO C.; SILVA T.; FERREIRA B.; ÁVILA-CAMPOS M.; CUNHA, F. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of mmps, rankl, and their physiological inhibitors. ***Oral Microbiol Immunol***. p.12-20. 2006.

GARTNER, L. P. Color textbook of histology. Philadelphia: Saunders, 1997.

HAN, S. Y.; LEE, N. K.; Kim, K. H.; JANG, I. W.; YIM, M.; KIM, J.H.; LEE, W. J, LEE, S. Y. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoclast precursors is involved in RANKL-induced osteoclastogenesis. ***Blood***. p.1240-1245. 2005.

HAYMAN, A. R.; MACARY, P.; LEHNER, P. J. Tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): identification in diverse human tissues and dendritic cells. ***J Histochem Cytochem***. p.675- 84. 2001.

HERMAM, S.; KRONKE, G.; SCHETT, G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. **Trends Mol Med.** p. 245-253. 2008.

HOOVER-PLOW, J. L.; GONG, Y.; SHCHURIN, A.; BUSUTTIL, S. J.; SCHNEEMAN, T. A.; HART, E. Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. **Inflammation Research.** p.457-463. 2008.

JANN, J.; GASCON, S.; ROUX, S.; FAUCHEUX, N. Influence of the TGF- $\beta$  superfamily on osteoclasts/osteoblasts balance in physiological and pathological bone conditions. **International Journal of Molecular Sciences.** 2020.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.

KANCZLER, J.M.; OREFFO, R. O Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **Eur Cell Mater.** p.100-114. 2008.

KANYAMA, M.; KUBOKI, T.; AKIYAMA, K.; NAWACHI, K.; MIYAUCHI F.; TAKIGAWA, M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. **Archives of oral biology.** p.723-730. 2003

KOMORI, T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. **Int J Mol Sci.** 2019.

KORANI S, KORANI M, SATHYAPALAN T, SAHEBKAR A. Therapeutic effects of Crocin in autoimmune diseases: A review. **Biofactors** p. 835-843. 2019.

LIN, Z.; RIOS, H. F.; VOLK, S. L.; SUGAI, J. V.; JIN, Q.; GIANNOBILE, W. V. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. **Journal of periodontology.** p.1007-1017. 2011.

LIN, Z.; RIOS, H. F.; VOLK, S. L.; SUGAI, J. V.; JIN, Q.; GIANNOBILE, W. V. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. **Journal of periodontology.** p.1007-1017. 2011.

LORENZO, J.; CHOI, Y.; HOROWITZ, M.; TAKAYANAGI, H. The developing field of osteoimmunology. **Osteoimmunology: interections of the imune and skeletal systems**. 2011.

LÖWIK, C. W.; NIBBERING, P. H.; VAN DE RUIT, M.; PAPAPOULOS, S. E. Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *The Journal of clinical investigation*. p.1465-1472. 1994.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine reviews**. p.115-137. 2000.

MANZANO-MORENO, F. J.; COSTELA-RUIZ, V.J.; MELGUIZO-RODRÍGUEZ, L, ILLESCAS-MONTES, R.; GARCÍA-MARTÍNEZ, O.; RUIZ, C.; RAMOS-TORRECILLAS, J. Inhibition of VEGF gene expression in osteoblast cells by different NSAIDs. **Archives of Oral Biology**. 2018.

MILORO, M. Princípios de cirurgia bucomaxilofacial de Peterson. **In Princípios de cirurgia bucomaxilofacial de Peterson**. p. 766-766. 2008.

MOHAMMAD, K.S.; CHEN, C. G.; BALOOCH, G.; STEBBINS, E.; MCKENNA, C. R, DAVIS, H.; NIEWOLNA, M.; PENG, X. H.; NGUYEN, D. H.; IONOVA-MARTIN, S. S.; BRACEY, J. W.; HOGUE, W. R.; WONG, D. H.; RITCHIE, R.O.; SUVA, L. J.; DERYNCK, R.; GUISE, T. A.; ALLISTON, T. Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. **PLoS One**. 2009.

MOONGA, B. S.; MOSS, D. W.; PATCHELL, A.; Zaidi, M. Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and evidence for a functional role in bone resorption. **The Journal of Physiology**. p.29-45. 1990.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*. p.958-969. 2008.

NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thrombosis and haemostasis**. p. S13-S33. 2011.

POLETI, M. L. Análise morfológica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2009.

RAUNER, M.; SIPOS W.; PIETSCHMANN, P. Osteoimmunology. *International archives of allergy and immunology*. p. 31-48. 2007.

RODRIGUES, M. T. V. Análise microscópica e histométrica comparativa da aplicação de uma pasta à base de metronidazol e da irrigação com iodeto de sódio e peróxido de hidrogênio para o tratamento de alvéolos dentários infectados de ratos. (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2009.

SINGH, K. B.; DIXIT, M.; MAURYA, R.; SINGH, D. Formononetin, a methoxy isoflavone, enhances bone regeneration in a mouse model of cortical bone defect. **British Journal of Nutrition**. p.1511-1522. 2017.

STEED, D. L. Wound-healing trajectories. **Surg Clin North Am**. p.547-555. 2003.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H., ROSENTHAL, S.I. Sirius red f3ba as a stain for connective tissue. **Arch Pathol. Lab. Med**. p. 69-72. 1964.

TAKAYANAGI H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res**. p. 287-293. 2005.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*. p.638-649. 2003.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?. **Injury**. p. S11-S25. 2007.

VIEIRA, A. E. Caracterização morfométrica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas. 2013.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Ver**. p.835-870. 2003.

WU, M; CHEN, G; LI, Y. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. **Bone research**, p. 1-21, 2016.

YANG, F.L.; HUA, K. F.; YANG, Y.L. TLR-independent induction of human monocyte IL-1 by phosphoglycolipids from thermophilic bacteria. *Glycoconj J.* p. 427-439. 2008.

ZAIDI, M.; MOONGA, B.; MOSS, D. W.; MACINTYRE, I. Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. **Biochem Biophys Res Commun.** p. 68-71. 1989.

## ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Análise comparativa do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos machos das linhagens 129Sv/Ev, C57Bl/6 e BALB/c**", Processo FOA nº 00443-2020, 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 02 de Outubro de 2020.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 02 de Outubro de 2021.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 02 de Novembro de 2021.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Comparative analysis of alveolar bone repair process among 129Sv/Ev, C57Bl/6 and BALB/c male mice**", Protocol FOA nº 00443-2020, 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 October 02, 2020.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** October 02, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** November 02, 2021.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator