



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araçatuba**

**RAMEZ HASSAN MAHMOUD**

**Análise do processo de reparo alveolar em camundongos fêmeas  
senescentes 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO sob terapia com  
bifosfonato de alta potência**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do título de Mestre no Programa de Odontologia, Área de concentração: *Implantodontia*.

**Orientadora:** Prof. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

**Coorientador:** Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba - SP  
2020**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M215a Mahmoud, Ramez Hassan.  
Análise do processo de reparo alveolar em camundongos fêmeas senescentes 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO sob terapia com bifosfonato de alta potência / Ramez Hassan Mahmoud. - Araçatuba, 2020  
62 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto

1. Difosfonatos 2. Camundongos 3. Modelos animais  
4. Osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos I. T. 5. Regeneração óssea.

Black D7  
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Dedicatória*

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

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

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

**Amigos**, são tantos e bons amigos que sempre estiveram ao meu lado, torcendo e vibrando por cada momento feliz – Amigos, o amor de vocês me mantém querendo lutar contra o tempo para continuar no caminho do aprendizado e do aprimoramento, mesmo quando o peso dos 4.9 já começam a importar.

**A eles, que tanto amo:**



**GLADSTONE**



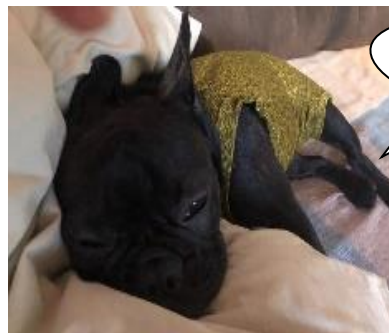
**THIERRY**



**BARACK E  
RENATA**



**HILLARY**



**DONATELLA**



**GIANNI**

*Agradecimentos especiais*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

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

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

**À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Angelina Zuque**, que na qualidade de Secretária Municipal de Saúde do Município de Três Lagoas, incentivou e viabilizou as compensações da carga horária de trabalho para que eu pudesse me dedicar às atividades do mestrado – Obrigado pelo apoio, Angelina.

*Agradecimientos*

## AGRADECIMENTOS

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

À **Faculdade de Odontologia de Bauru -USP**, especialmente ao Departamento de Materiais Dentários e Endodontia e ao Laboratório de Anatomia.

À **Unisagrado**, pela disponibilização do biotério e laboratório.

### À FAPESP

Processo nº 2018/08913-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**Ao Professor Ass. Leonardo Perez Faverani**, pela coorientação e por ter sido um dos primeiros mestres e incentivadores na área da implantodontia.

**Ao Professor Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte**, por ter disponibilizado o serviço de microtomografia do Departamento de Dentística, Materiais Dentários e Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

**Ao Professor Titular Dr. Jesus Carlos Andreo**, por ter disponibilizado o Laboratório de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, onde foram realizadas as fotomicrografias.

**A Professora Dr<sup>a</sup> Dulce Helena Jardim Constantino**, por ter cedido os animais para a pesquisa.

**A Sr<sup>a</sup> Maira Cristina Rondina Couto**, por ter confeccionado todas as lâminas para as análises dessa pesquisa.

*Agradecimentos institucionais*

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

**À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em especial à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, nas pessoas do diretor Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.**

*Epigrafe*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(Almir Sater)

*RESUMO*

MAHMOUD, R. H. **Análise do processo de reparo alveolar em camundongos fêmeas senescentes 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO sob terapia com bifosfonato de alta potência** 2020. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

## RESUMO

O processo de senescência acarreta uma série de modificações fisiológicas com declínio das funções das atividades celulares e sistêmicas que se manifestam de maneira mais importante na população feminina pelo evento da menopausa, como a osteoporose. A fim de se minimizar tais efeitos, há a possibilidade de se utilizar medicamentos que diminuem o processo de remodelação óssea como os bifosfonatos nitrogenados (BF). Entretanto, o uso dessas drogas está intimamente relacionado ao desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares (OM), principalmente quando associado a outros fatores de risco como as cirurgias bucais. Sabe-se que fisiologicamente a dinâmica do tecido ósseo depende também de eicosanóides derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA), como as enzimas cicloxigenase (COX) e 5 lipoxigenase (5LO). Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito BF ácido zoledrônico (ZL) e sua relação com o desenvolvimento da OM em camundongos fêmeas senescentes 129/Sv com e sem modificação genética para a enzima 5LO. Para tanto, foram utilizados 40 camundongos fêmeas senescentes 129/Sv, sendo 20 WT e 20 com alteração no gene 5LO (129 Alox5tm1Fun/J) (5LOKO), divididas em grupos: WT, tratadas com 0,01 ml de solução salina 0,9% estéril (SS) via intraperitoneal (IP) e ZL, tratadas com 250µg/Kg de ácido zoledrônico (ZL) IP diluído em solução salina estéril, ambas administradas 1 vez/semana por 7 semanas. Os grupos foram compostos por 5 animais cada (WT Controle – 7 e 21 dias, WT ZL – 7 e 21 dias, 5LOKO Controle – 7 e 21 dias, 5LOKO ZL – 7 e 21 dias), sendo as maxilas coletadas para análises em microCT, histopatológica, birrefringência, técnica imunohistoquímica e histomorfométricas. De modo geral, a microCT revelou deficiência significativa na microarquitetura óssea nos animais WT ZL em comparação com os demais. Do mesmo modo, a partir da análise histopatológica e de birrefringência da matriz colagenosa, observou-se padrão compatível com o desenvolvimento de OM no grupo WT ZL, com presença de infiltrado inflamatório intenso, atraso na neoformação óssea, presença de fraturas patológicas, e deficiência da matriz colagenosa e de células Runx-2+, TRAP+ e F4/80+. Os animais 5LOKO ZL apresentaram alterações compatíveis com atraso no processo de reparo especialmente no período de 7 dias, com menor quantidade de células Runx-2+ em comparação com o grupo 5LOKO Controle e pela qualidade da matriz óssea colagenosa com menor quantidade de fibras do espectro vermelho neste período, se igualando, porém, aos 21 dias. Deste modo, concluiu-se que o processo de reparo em camundongos fêmeas senescentes da linhagem 129/Sv WT e 5LOKO associados ao uso do BF ZL ocorreu de modo distinto, levando a quadro de OM nos animais WT e atraso nos animais 5LOKO, sem sinais histopatológicos que caracterizassem a doença. Deste modo, a inibição da enzima 5LO parece influenciar de maneira positiva o processo de reparo ósseo intramembranoso alveolar, mesmo na presença de fenótipo esquelético osteopetrótico, sugerindo outros fatores relacionados à droga que favoreçam o desenvolvimento da OM no presente modelo animal.

**Palavras-chave:** Bifosfonatos. Camundongos. Modelo animal. Osteonecrose dos maxilares. Reparo alveolar.

*ABSTRACT*

MAHMOUD, R. H. **Alveolar bone repair of 129/Sv WT and 129/Sv 5LOKO female senescent mice under therapy with high potency bisphosphonate.** 2020. 62 f. Master's (Dissertation) – Dental School, São Paulo University, Araçatuba, 2020.

### ABSTRACT

Senescence brings a number of physiological modifications with the decrease of cell and systemic activities and function that manifest in an important way in female population due to the event of menopause, as osteoporosis. In order to diminish these effects, there is the possibility of taking medication that decrease bone remodeling process, as the bisphosphonates containing nitrogen (BF). However, the use of these drugs is intimate related with the development of the osteonecrosis of the jaws (ON), especially when associated to other risk factors as oral surgery. It is known that physiologically, the dynamics of bone tissue also depends on the eicosanoids derivate from the arachidonic acid metabolism (AA), such as cyclooxygenase (COX) and 5 lipoxygenase (5LO) enzymes. In this way, the aim of the present study was to analyze the effects of the BF zoledrônico acid (ZL) and its relation with de development of ON in 129/SV old female mice with or without genetic modification for 5LO. Forty animals, 20 WT and 20 with 5LO gene alteration (129 Alox5tm1Fun/J) (5LOKO) were divided in groups: WT, treated with 0.01 ml of sterile 0.9% saline solution (SS) intraperitoneal (IP), and ZL, treated with 250µg/Kg of ZL IP diluted in SS, both administered once a week for 7 weeks. Groups contained 5 animals each (WT Control – 7 and 21 days, WT ZL ,7 and 21 days, 5LOKO Control, 7 and 21 days, and 5LOKO ZL, 7 and 21 days), and the maxillae removed for microCT, histopathology, birefringence, immunohistochemistry, and histomorphometric analysis. In general, microCT revealed significant deficiency in bone microarchitecture in WT ZL group in comparison to the other groups. In the same way, histopathological and birefringence analysis revealed histological pattern compatible with ON development in WT ZL group, presenting intense inflammatory infiltrate, late new bone formation, presence of pathological fractures, and deficiency in collagenous matrix, and also in Runx-2+, TRAP+, and F4/80. 5LOKO ZL animals presented alterations compatible with a late bone repair, especially at day 7, with decreased number of Runx-2+ cells in comparison to 5LOKO Control, and by the quality of collagenous bone matrix with decreased number of red spectra fibers in this period, however, being similar at day 21. From this, it could be concluded that alveolar bone repair of 129/SV WT and 5LOKO old female mice associated with the administration of ZL occurred in different ways, leading to a picture of ON in the WT animals, and late bone repair in the 5LOKO animals, without histopathological signs that could characterize the disease. In this way, inhibition of 5LO seems to influence intramembranous alveolar bone repair in a positive way, even in the presence of osteopetrotic skeletal phenotype, suggesting other factors related to the drug that favors the development of the ON in the present animal model.

**Keywords:** Bisphosphonates. Mice. Animal model. Osteonecrosis of the Jaws. Alveolar repair.

*LISTA DE FIGURAS*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** **Análise microtomográfica dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senescentes WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana).** **A-** BV/TV % (proporção de osso por tecido total); **B-** Tb.Sp (separação ou espaçamento em mm entre as trabéculas ósseas neoformadas); **C-** Tb.Th (espessura em mm de trabéculas ósseas neoformadas; **D-** Tb.N (número de trabéculas ósseas neoformadas). Os gráficos foram plotados no formato boxplot, apresentando valores de máximo e mínimo da distribuição, bem como a mediana. Tabelas adicionais mostram valores de média e desvio padrão. Diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \* contendo os valores de  $p \leq 0.05$ . Grupos com tendência à diferença estatística apresentam apenas os valores de p 43
- Figura 2 -** Aspecto de hiperdensidade em imagem 2D (A) e 3D (B) dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senescentes WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana) 44
- Figura 3 -** Imagens representativas do aspecto histopatológico dos grupos WT, WT-ZL, 5LOKO e 5-LOKO-ZL aos 7 e 21 dias experimentais (HE e TG, aumentos 10x e 100x) 46
- Figura 4 -** **Análise de birrefringência dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senescentes WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana).** **A-** Imagens comparativas em campo claro e por luz polarizada (aumento 20x). **B-** Os gráficos demonstram os resultados da análise quantitativa de fibras colágenas totais, e nos espectros vermelho, amarelo e verde. Os gráficos foram plotados no formato boxplot, apresentando valores de máximo e mínimo da distribuição, bem como a mediana. Diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \* 47
- Figura 5 -** Imagens representativas das células marcadas positivamente para TRAP, Runx2 e F4/80 pela técnica imuno-histoquímica. **B-D)** Os gráficos demonstram os resultados da análise quantitativa de das células marcadas positivamente para cada anticorpo. Os gráficos foram plotados no formato boxplot, apresentando valores de máximo e mínimo da distribuição, bem como a mediana. Diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \* 49

*LISTA DE TABELAS*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido	37
<b>Tabela 2 -</b>	Média e desvio padrão da análise quantitativa de birrefringência	48
<b>Tabela 3 -</b>	Média e desvio padrão da análise quantitativa das células positivamente marcadas pela técnica imuno-histoquímica para as proteínas TRAP, RUNX-2 e F4/80	49

*LISTA DE ABREVIATURAS*

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	PORCENTAGEM
<	MENOR
°C	GRAUS CÉLSIUS
µg/Kg	MICROGRAMA POR QUILO
¶	DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE
129 Alox5 <sup>tm1Fum</sup> /J	GENE PARA A ENZIMA 5LIPOXIGENASE
5LO	5 LIPOXIGENASE
5LOKO	5 LIPOXIGENASE KNOCKOUT
AA	ÁCIDO ARACDÔNICO
BF	BIFOSFONATO
BV/TV	VOLUME ÓSSEO EM RELAÇÃO À QUANTIDADE TOTAL
CEUA	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
COX2	CICLOXIGENASE
CXCL 10	C-X-C MOTIF LIGAND 10
CysLT	CISTENIL LEUCOTRIENO
d	DIA
DP	DESVIO PADRÃO
E <sub>1</sub>	ESTRONA
E <sub>2</sub>	ESTRADIOL
EDTA	ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
HE	HEMATOXILINA e EOSINA
ICS	INCISIVO CENTRAL SUPERIOR
IGF	FATOR DE CRESCIMENTO
IL	INTERLEUCINA
IP	INTRA PERITONEAL
KO	KNOCKOUT
LTB4	LEUCOTRIENO B4
M1/M2	MACRÓFAGO
M-CSF	FATOR ESTIMULADOR DE NECROSE
Mg/kg	MILIGRAMA POR QUILO
microCT	MICROTOMOGRÁFIA
N-BF	BIFOSFONATO NITROGENADO
NF-κβ (RANKL)	LIGANTE DO RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA B
NO	ÓXIDO NÍTRICO
OC	OSTEOCLASTO
OCN	OSTEOCALCINA
OM	OSTEONECROSE DOS MAXILARES
OP	OSTEOPONTINA
OPG	OSTEOPROTEGERINA
P	PROBABILIDADE DE SIGNIFICÂNCIA
PGE2	PROSTAGLANDINA E2 (EICONSANOIDE)
PVPI	POLIVINILPIRROLIDONA
REα	RECEPTOR DE ESTRÓGENO DE SUPERFÍCIE
REβ	RECEPTOR DE ESTRÓGENO NUCLEAR
RNS	REACTIVE NITROGEN SPECIES
ROS	REACTIVE OXIGEN SPECIES
RUNX+	RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR (POSITIVA)
SERMs	MODULADORES SELETIVOS DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO

<b>SS</b>	SOLUÇÃO SALINA
<b>Tb.N</b>	NÚMERO DE TRABÉCULAS
<b>Tb.Sp</b>	SEPARAÇÃO DE TRABÉCULAS
<b>Tb.Th</b>	ESPESSURA DE TRABÉCULAS
<b>TG</b>	TRICOTÔMICO DE GOLDNER
<b>TGF<math>\beta</math></b>	FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	FATOR DE NECROSE TUMORAL
<b>TRAP+</b>	FOSFATASE ÁCIDO RESISTENTE AO TARTARATO (POSITIVA)
<b>VEGF<math>\alpha</math></b>	FACTOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR
<b>WT</b>	WILD TYPE
<b>ZL</b>	ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

*SUMÁRIO*

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	Introdução.....	28
<b>2.</b>	Objetivo .....	34
<b>3.</b>	Material e métodos.....	36
3.1	Animais.....	36
3.2	Desenho experimental.....	36
3.3	Procedimento cirúrgico.....	37
3.4	Eutanásia e coleta.....	37
3.5	Micro CT.....	38
3.6	Preparação das amostras.....	38
3.7	Análises histopatológicas.....	38
3.8	Análise de birefringência.....	39
3.9	Técnica imuno-histoquímica.....	39
3.1.1	Análises histomorfométricas.....	40
<b>4.</b>	Resultados.....	42
4.1	Análise microtomográfica.....	42
4.2	Análise histopatológica.....	44
4.3	Análise de birrefringência.....	45
4.4	Análises imuno-histoquímicas.....	48
<b>5.</b>	Discussão.....	51
<b>6.</b>	Conclusão.....	54
	Referências.....	56
	Anexos.....	61

*INTRODUÇÃO*

## 1 INTRODUÇÃO

A expectativa média de vida da população mundial vem crescendo nos últimos 200 anos devido à melhora nas condições de saneamento básico, imunização, medicamentos e atendimento médico, entre outros fatores que contribuem para a qualidade de vida (PARTRIDGE; DEELEN; SLAGBOOM, 2018). No entanto, o processo de envelhecimento acarreta uma série de alterações na homeostasia do organismo, decorrentes principalmente de modificações complexas que ocorrem no sistema endocrinológico que influenciam as funções reprodutivas, metabólicas, nutricionais, com efeitos diretos sobre o sistema musculoesquelético, imunológico e na sinalização insulínica. O envelhecimento do sistema endocrinológico afeta diretamente o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, sendo mais expressivo nas mulheres e resultando em drástica redução dos hormônios sexuais que ocorre predominantemente por volta da quinta década de vida, durante o evento da menopausa (CHAPURLAT et al., 2000).

Assim, a menopausa marca um período de transição que se inicia com o fim do ciclo menstrual devido à ausência de ovulação (amenorreia) e que pode se estender por anos predispondo as mulheres a uma série de eventos psicogênicos/comportamentais, além de aumentar os riscos de doenças cardiovasculares, metabólicas, e de modo importante, alterações no sistema musculoesquelético, com atenção especial à osteoporose. Com o fim do ciclo reprodutivo, há uma redução de 90% do estrógeno circulante, levando à sua formação extra-glandular predominantemente pelo tecido adiposo e pele, com uma pequena contribuição das adrenais (JONES; BOELAERT, 2015). Os hormônios estrogênicos são derivados dos metabólitos C19 do colesterol e abrange uma série de moléculas, sendo que o  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) produzido nos ovários é o mais abundante. Após a menopausa, a forma circulante que predomina do estrógeno é a estrona ( $E_1$ ), sintetizada em locais extra-ovarianos, incluindo o tecido ósseo (MANOLAGAS; ALMEIDA; JILK, 2009). A relação entre os hormônios sexuais e o tecido ósseo recai sobre os efeitos que os mesmos exercem sobre suas células, uma vez que osteoclastos e osteoblastos apresentam receptores de estrógeno de superfície e nuclear,  $RE\alpha$  e  $RE\beta$  respectivamente. Cerca 50 a 60% de testosterona e de 20 a 40% do  $E_2$  total na circulação sanguínea em mulheres estão ligados fortemente ao ligante de hormônio sexual da globulina, sendo que, do total de  $E_2$ , somente 2% é livre para entrar nas células e exercer seus efeitos biológicos (SIITERI et al., 1982). No período reprodutivo da mulher os estrogênios promovem o desenvolvimento dos osteoblastos em detrimento aos adipócitos, aumentam sua capacidade proliferativa e de produção de proteínas, como a osteoprotegerina (OPG). Nos osteoclastos induzem à apoptose e diminuem a produção do ligante do receptor do fator nuclear NF-KB

(RANKL). Deste modo, a drástica redução dos estrogênios que já se inicia nos anos que antecedem a menopausa, denominada perimenopausa, especialmente do E<sub>2</sub>, resulta em um prejuízo importante no tecido ósseo com redução de massa óssea e do conteúdo mineral, alterações na arquitetura óssea, aumento de medula gordurosa, e conseqüente aumento do risco de fraturas e capacidade de reparação (BOROS; FREEMONT, 2017), continuando no período da menopausa e após. A maior incidência de fraturas se concentra na primeira década após a menopausa, tendo como alvo principal a região de punho e tornozelo, seguida das vértebras após a segunda década.

Além dos efeitos dos estrógenos no metabolismo ósseo, faz-se importante ressaltar que os mesmos exercem efeitos indiretos no esqueleto mediados via citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), RANKL, OPG, fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), prostaglandina, bem como sobre as células T e B, macrófagos e células dendríticas.

A fim de se minimizar tais efeitos existem algumas possibilidades terapêuticas, como reposição de cálcio, reposição hormonal, administração de moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs) e o tratamento com o uso de bifosfonatos. Dentre estas alternativas, destacam-se os bifosfonatos nitrogenados (N-BFs), uma classe de medicamentos que atuam diretamente sobre osteoclastos exercendo um efeito inibitório da remodelação óssea, motivo pelo qual são utilizados como droga de primeira escolha para o tratamento de doenças caracterizadas por intensa reabsorção óssea por apresentarem efeitos benéficos importantes em sítios alvo do esqueleto (coluna vertebral e ossos longos), melhorando a densidade óssea e atuando na prevenção de fraturas e colapso vertebral (ERIKSEN; DÍEZ-PÉREZ; BOONEN, 2014). Os BFs exercem uma função semelhante à dos pirofosfatos endógenos, possuindo importante afinidade com a hidroxiapatita nos ossos. Estas drogas atuam suprimindo o recrutamento e a atividade de osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea, cujos efeitos podem ser medidos considerando-se a farmacodinâmica e farmacocinética do BF a ser utilizado, bem como o tipo de apresentação e a via de administração, as quais interferem diretamente na sua biodisponibilidade (CREMERS; PILLAI; PAPAPOULOS, 2005).

Entretanto, o uso dessas drogas antirreabsortivas tem sido também relacionado com o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares (OM), principalmente quando os seus usuários são submetidos a tratamentos odontológicos invasivos, como por exemplo procedimento exodôntico. Neste sentido, a instalação das OMs tem sido principalmente atribuída ao mecanismo de ação desta classe de medicamentos sobre as células do tecido ósseo, onde N-BPs atuam inibindo principalmente os osteoclastos (OC) e diminuindo o ritmo de remodelação óssea

(COXON et al., 2008; ROGERS et al., 2011). Especificamente em relação aos OCs, após ser internalizado por estas células, os N-BPs causam a desorganização do seu citoesqueleto, provocando a perda de sua borda corrugada e levando tais células à apoptose (GUTTA; LOUIS, 2007). Já sobre osteócitos, os N-BPs agem bloqueando o processo de apoptose de células danificadas, levando-as à senescência, afetando sua função e capacidade de responder aos estímulos que causam danos a matriz óssea (ROELOFS et al, 2010).

Diante de tais evidências acerca dos efeitos dos bifosfonatos sobre as células ósseas, a patogenia das OM tem sido atribuída à baixa capacidade de resposta do tecido ósseo na região craniomaxilofacial e ainda a uma baixa vascularização desses ossos, devido ao turnover reduzido nessa área (BONEWALD, 2011; LOISELLE; JIANG; DONAHUE, 2013). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares iniciais que deflagram esse processo inicial ainda estão pouco esclarecidos, bem como os fatores de risco associados, a exemplo da senescência do tecido ósseo. Apesar das claras evidências sobre a ação dos N-BPs sobre as células ósseas e da atribuição do desenvolvimento das OMs a estes efeitos, recentes investigações têm apontado para outras atuações deste grupo de drogas sobre o sistema imunológico. Somado a isso, sabe-se ainda que as condições microbiológicas do ambiente bucal frente a condições inflamatórias patológicas, como a doença periodontal, ou condições traumáticas, como as pós-cirúrgicas, podem também favorecer o desenvolvimento das OMs (MARX et al., 2005), reforçando as evidências que relacionam a etiologia das OMs com supressão da resposta imunológica causada pelos N-BPs.

Tem sido demonstrado que os N-BPs possuem uma importante relação com as células do sistema mononuclear fagocitário, monócitos e macrófagos (HOEFERT et al., 2015 WEHRHAN et al., 2017; ZHANG et al., 2012), cuja origem na medula óssea é a mesma dos osteoclastos, e que deste modo, compartilham uma série de moléculas reguladoras e sinalizadoras (NAKASHIMA; TAKAYANAGI, 2009). Assim como os osteoclastos, outros estudos têm revelado que os monócitos e macrófagos também são capazes de internalizar molécula de BPs (ROELOFS et al., 2010; ROGERS et al., 2011). Neste sentido, vale ressaltar que monócitos e macrófagos constituem uma importante classe de células do sistema imune inato, atuando tanto no estabelecimento inicial da resposta do hospedeiro frente a diferentes injúrias, quanto na regulação da resposta imune adaptativa. Estudos anteriores demonstram que estas células têm um papel importante na fisiologia e no processo de reparo ósseo, tanto macrófagos residentes (já presentes no tecido ósseo previamente à condição inflamatória), quanto os macrófagos recrutados em decorrência do processo inflamatório. Neste contexto, macrófagos recrutados para o processo de reparo ósseo pós exodontia podem desempenhar

tanto funções fagocitárias, contribuindo para remoção dos debris pós exodontia, quanto contribuindo para funções regulatórias, através da produção de citocinas e fatores de crescimento (BIGUETTI et al., 2018).

Dentro do contexto imunológico e regulatório, sabe-se que os macrófagos recrutados para sítios de inflamação podem polarizar para diferentes subtipos, sendo eles M1 inflamatório e M2 regenerativo. Sabe-se que o perfil M1, normalmente marcado pelo receptor de superfície CD80, está relacionado à produção de IL-1, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$  e CXCL10, bem como de ROS e RNS, como o óxido nítrico (NO), e portanto desempenham uma importante atividade microbicida e pró-inflamatória no desenvolvimento da resposta imune. Por outro lado, macrófagos M2 estão relacionados à expressão de altos níveis de fatores de crescimento, tais como IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina), VEGFa, TFGbeta e IL10, participando da indução do reparo, resolução do processo inflamatório e estímulo da angiogênese.

Além disso, os processos de reabsorção e deposição óssea são regulados através de liberação de mediadores inflamatórios, que são derivados do ácido araquidônico (AA) (LIN; O'CONNOR, 2014). Dentre as enzimas envolvidas no metabolismo do AA, tanto a ciclooxigenase-2 (COX-2), quanto a 5-Lipoxigenase (5-LO) são identificadas em sítios específicos durante o reparo ósseo (LIN; O'CONNOR, 2014) e são altamente expressas em células inflamatórias como macrófagos. Enquanto os produtos da COX-2 (especificamente a PGE2) são principalmente atribuídos como importante fator para a reparação óssea, os produtos da 5LO, LTB4 e cistenil leucotrieno (CysLT), possuem um efeito oposto, com papel reabsortivo em virtude da indução à osteoclastogênese (BONEWALD et al., 1997; GARCIA et al., 1996). De fato, camundongos geneticamente deficientes para a enzima 5-LO apresentam um reparo acelerado de fratura em ossos endocondrais, demonstrando que tal enzima regula negativamente o reparo do tecido ósseo.

Quanto ao desenvolvimento das OMs, sabe-se que dentre os vários fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento encontram-se os procedimentos exodônticos, bem como o uso de bifosfonatos de alta potência, sendo o zoledronato ou ácido zoledrônico o de maior risco (RUGGIERO et al., 2014). Neste sentido, é importante considerar que a ação do zoledronato pode causar um distúrbio no metabolismo dos macrófagos e na resposta inflamatória, resultando em uma condição inflamatória exacerbada, bem como na inibição da angiogênese, redução da oxigenação tecidual, favorecendo a invasão de microrganismos e uma subsequente infecção secundária. Isso tem sido demonstrando em alguns modelos de OM, ocorrendo uma desregulação no balanço de macrófagos M1/M2 com predominância de

macrófagos M1 em sítios de OM (ZHANG et al., 2012). Sabe-se também que macrófagos são capazes de produzir IL-17, potencializando sua ação inflamatória associada ao uso de bifosfonatos, causando o desequilíbrio da proporção de macrófagos M1/M2 com a indução da IL-17 e redução de IL-4, como observado neste estudo anterior, em que sugeriu-se que a combinação da redução de células T-regulatórias e aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-17, bem como macrófagos M1, causam o prolongamento da resposta inflamatória em sítios de injúria óssea induzindo a osteonecrose dos maxilares.

Diante das evidências aqui apontadas sobre o potencial envolvimento de N-BP com a desregulação da resposta imune/inflamatória em sítios de OM, torna-se oportuno o estudo sobre a influência da ação do ácido zoledrônico sobre o reparo ósseo após exodontia em camundongos fêmeas e senis, com fenótipo WT em comparação a um animal que apresenta fenótipo ósseo petrótico devido à deficiência da enzima 5LO, importante para a resposta inflamatória e osteoclastogênese (5LOKO). Neste sentido, a comparação do reparo ósseo pós exodontia em animais fêmeas e senis, em uma condição controle (WT) ou 5-LOKO, pode contribuir para elucidar e confirmar se a patogênese da OM está diretamente envolvida com a supressão de osteoclastos em indivíduos de idade avançada ou se outros fatores imunológicos são também afetados.

*OBJETIVO*

## **2 OBJETIVO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o processo de reparo alveolar frente ao uso de bifosfonato de alta potência (ácido zoledrônico – ZL) em camundongos fêmeas senescentes das linhagens 129/SV WT e 5LOKO.

*MATERIAL E MÉTODOS*

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Quarenta camundongos fêmeas da linhagem 129 SvEv foram utilizados no presente estudo, com idade de 60 semanas, sendo vinte WT e vinte com alteração no gene 5LO (129 Alo<sup>x5<sup>tm1F<sup>un</sup></sup>/J, designado aqui como 5LOKO). Os animais WT e 5LOKO foram adquiridos do biotério central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, SP, Brasil e mantidos no biotério da UNISAGRADO, Bauru, SP, Brasil a partir da idade de 8 semanas até 68 semanas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais desta instituição (CEUA nº 9589271017), sendo executados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.)* e o guia de recomendações ARRIVE (KILKENNY et al., 2010).</sup>

#### 3.2. Desenho experimental e administração do ácido zoledrônico

O ciclo estral dos camundongos foi avaliado conforme já descrito na literatura. Resumidamente, a citologia vaginal foi coletada e o esfregaço corado com azul de toluidina. Os animais com 60 semanas apresentaram citologia com predominância de leucócitos e poucas células epiteliais por duas semanas consecutivas, indicando persistência da fase diestro. 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 foi fornecida ração pastosa. Assim, camundongos fêmeas com 64 semanas foram divididos de acordo com o seguinte tratamento: Controle, tratados com 0,01 ml de solução salina 0,9% estéril (SS) via intraperitoneal (IP) e ZL, tratados com 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de ácido zoledrônico (Merck KGaA, SML0223, Darmstadt, Alemanha) IP diluído em SS estéril. Ambas soluções foram administradas uma vez por semana durante 4 semanas consecutivas antes das extrações dentárias e continuando até o período das eutanásias para a coleta dos espécimes. Após os períodos de 7 e 21 dias pós-exodontia, 5 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia a fim de se proceder a coleta dos espécimes e as análises dos alvéolos por meio de microtomografia computadorizada (microCT), análises histológicas com cortes corados em HE e Tricrômico de Goldner, análise da matriz colagenosa por birrefringência em cortes corados com Picrosirius-red, e técnica de imuno-histoquímica para análise de diferentes marcadores ósseos do reparo ósseo alveolar (Runx2,  $\gamma$ -TRAP) e inflamatórios F4/80

### 3.3 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®, Agribrands do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg - Anasedan®, Agribrands 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 sulcular ao redor do dente incisivo superior (ICS) direito com lâmina de bisturi número 15c. Em ato contínuo, foi realizada divulsão da mucosa inserida com o auxílio de uma sonda exploradora adaptada, conforme previamente descrito na literatura, a mesma utilizada para luxação e extração propriamente dita (BIGUETTI et al., 2018). Todo o procedimento foi feito com 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. Os animais foram divididos em quatro grupos distintos de acordo com o tipo de tratamento como mostra a Tabela 1.

**TABELA 1 - Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido**

Identificação do grupos	n	Tratamento
Grupo WT-Controle	10	129/Sv-WT – 0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP 1x por semana
Grupo WT-ZL	10	129/Sv-WT – 250µg/Kg de ácido zoledrônico IP 1x por semana*
Grupo 5-LOKO-Controle	10	129/Sv 5-LOKO - 0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP 1x por semana
Grupo 5-LOKO- ZL	10	129/Sv 5-LOKO – 250µg/Kg ácido zoledrônico IP 1x por semana*

\* Pozzi et al., 2009.

Fonte: Autor

### 3.4 Eutanásia dos animais e coleta dos espécimes

Os animais foram selecionados ao acaso em número de 5 por grupo nos períodos de 7 e 21 dias após o procedimento cirúrgico, sendo eutanasiados por meio sobredosagem do anestésico

cloridrato de quetamina (250mg/Kg) via IP. Constatada a morte dos animais, as maxilas contendo os alvéolos extraídos foram imediatamente imersas em frascos individuais contendo formalina a 10% tamponada.

### ***3.5 Micro CT***

Decorridas 48 horas do processo de fixação, os espécimes foram lavados em água corrente por 24 horas e acondicionados em álcool 70° a fim de serem submetidos à escaneamento em  $\mu$ CT (SkyScan 1174v2, Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica) para posteriores análises quantitativa e qualitativa do tecido ósseo neoformado. As imagens obtidas a partir do escaneamento, foram reconstruídas e analisadas por meio do software CTAnalyzer (SkyScan), para determinação do volume ósseo neoformado em relação a quantidade total de tecido (BV/TV, %), bem como para parâmetros morfológicos como número de trabéculas (Tb.N, mm), espessura (Tb.Th, mm) e separação de trabéculas (Tb.Sp, mm), conforme recomendado pela literatura.

### ***3.6 Preparação das amostras para procedimentos histotécnicos***

Finalizadas as capturas de imagem e escaneamentos dos espécimes, os mesmos foram acondicionados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 10 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 (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido coronal, utilizando-se micrótomo Leica RM. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5  $\mu$ m de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), tricrômico de Goldner + Alcian blue (TG+Ab) e Picrosirius Red, e cortes de 3  $\mu$ m de espessura para técnica imuno-histoquímica.

### ***3.7 Análises histopatológicas em H&E e TG+Ab***

A análise qualitativa descritiva dos defeitos foi feita em todos os cortes corados em HE e TG, considerando-se 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, bem como as condições da mucosa bucal sobrejacente com relação às condições do epitélio de revestimento e lâmina própria das áreas correspondentes aos alvéolos.

### ***3.8 Análise de birrefringência***

Os cortes corados com Picrosirius-red foram analisados em microscópio de luz polarizada a fim de se avaliar a organização e quantidade de feixes de fibras colágenas considerando-se a intensidade de birrefringência da matriz colagenosa. A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência será realizada utilizando-se o software KS 300/400 com AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Inicialmente foram definidos os espectros de cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (red, green, blue), os quais foram padronizados para todas as imagens, conforme já padronizado previamente (VIVAN et al., 2016). 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. Posteriormente, calculadas as médias dos valores em pixels<sup>2</sup> e submetidas a análise estatística para cálculo das médias e desvios-padrão de cada grupo em cada período experimental.

### ***3.9 Técnica imuno-histoquímica***

Para a determinação dos padrões moleculares da região de reparo ósseo foram padronizados os anticorpos para a identificação de macrófagos por meio da proteína F4/80 (sc-26643-R, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), bem como a qualidade do tecido ósseo por meio de marcação do fator de transcrição Runx-2 (sc-8566) para osteoblastos e TRAP (sc-30832) para osteoclastos. Para tanto, cortes de 3mm foram tratados com proteinase K por 30 minutos em temperatura ambiente. A peroxidase endógena será 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 indicados na Tabela 2, 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, Immunobioscience Corp., 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 foi omitido o anticorpo primário. Uma vez realizadas as marcações, as mesmas foram submetidas a análise quantitativa utilizando-se o software ImageJ.

### ***3.10 Análises histomorfométricas***

Foram capturados 10 campos em objetiva de 100x dos cortes coronais da região média dos alvéolos corados pela técnica de imuno-histoquímica a fim de se proceder a contagem das células imunomarcadas pelos anticorpos relacionados. Os cortes corados com Picrosirius-red foram capturados em microscópio de luz polarizada e as fibras colágenas quantificadas em programa Image ProPlus 5.0 (Nikon, Tóquio, Japão). Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos considerando-se nível de significância de 5%.

*RESULTADOS*

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise Microtomográfica

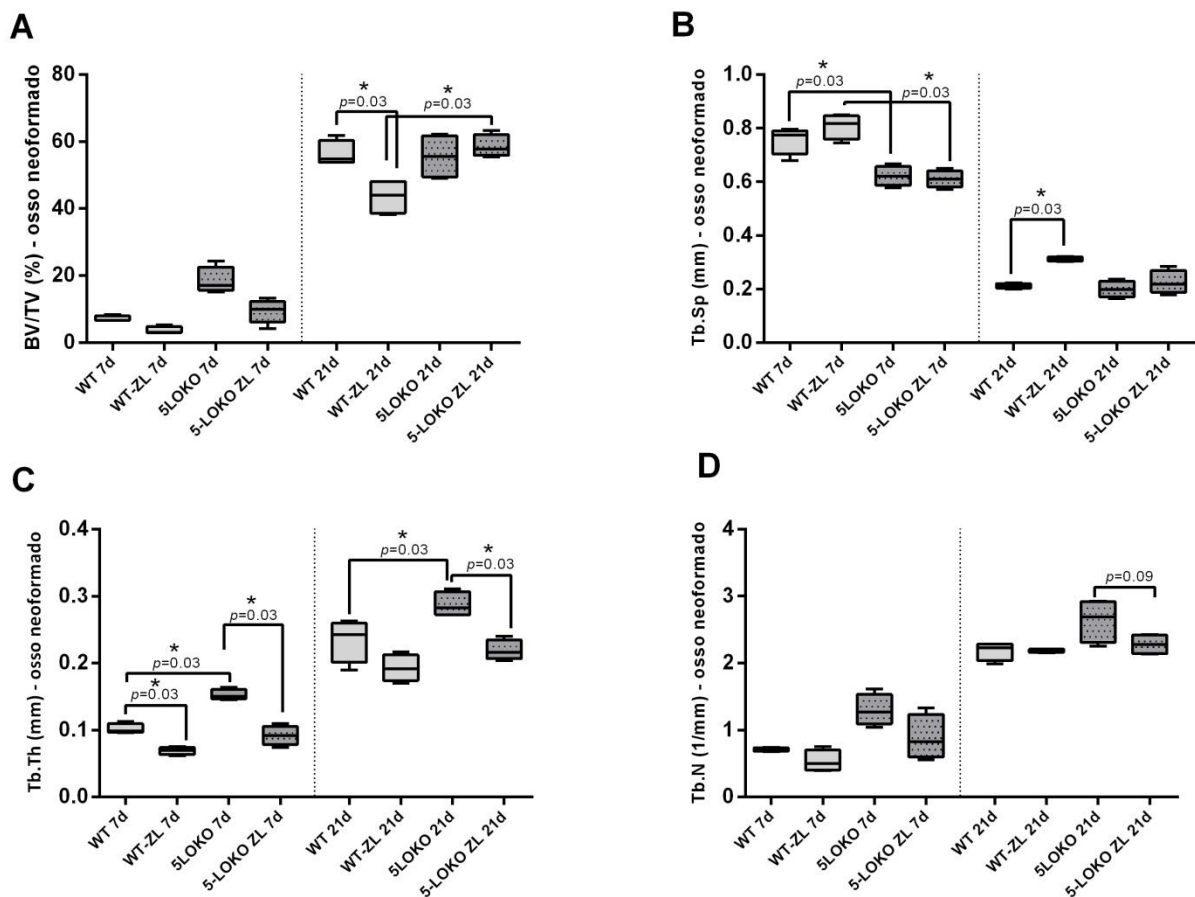
Na análise quantitativa, todos os dados foram inicialmente analisados para quanto a sua distribuição da normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. A maioria dos grupos apresentou distribuição fora da normalidade, sendo escolhidos testes não paramétricos. Posteriormente, foram atribuídos os testes Kruskal Wallis seguido de Duns para análises entre mais de dois grupos e o Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos dentro de um mesmo período experimental. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Os gráficos foram plotados no formato boxplot, apresentando valores de máximo e mínimo da distribuição, bem como a mediana. Tabelas adicionais mostram valores de média e desvio padrão. Diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \*.

Em relação a proporção de osso neoformado (BV/TV, %), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos aos 7 dias. Já no período de 21 dias pós exodontia, o grupo WT Controle apresentou  $56,34 \pm 3,8\%$  de osso neoformado, enquanto os animais WT tratados com ZL apresentaram  $43,55 \pm 5,27\%$ , sendo estatisticamente diferentes. Já os animais 5LOKO não apresentaram diferenças entre si, considerando-se os controles (SF) e os tratados com ZL. De forma importante, o grupo WT ZL e o grupo 5LOKO ZL foram diferentes entre si aos 21 dias, de modo que os animais 5LOKO ZL apresentaram maior neoformação óssea (Figura 1A, Tabela 1).

Em relação aos parâmetros morfológicos (Tb.Sp, Tb. Th e Tb.N), os grupos também demonstraram diferenças estatisticamente significantes, de forma coerente com valores de BV/TV. A figura 1B mostra o espaçamento em mm (Tb.Sp) entre as trabéculas ósseas, que foi maior nos grupos WT-ZL comparado ao WT Controle e 5LOKO ZL comparado 5LOKO controle aos 7 dias. Já aos 21 dias, as diferenças significantes se mantiveram apenas entre WT Controle e WT ZL, sendo que o espaçamento entre trabéculas continuou aumentado em WT ZL (Figura 1B, Tabela 1). Inversamente proporcional, a espessura trabecular foi significativamente maior em geral nos grupos WT e 5LOKO controles comparados aos seus respectivos grupos ZL aos 7 dias. Já aos 21 dias, 5LOKO controle apresentou maior espessura trabecular comparado ao WT Controle, e 5LOKO ZL apresentou menor espessura comparado ao seu controle (Figura 1C, Tabela1). Por fim, não houve diferença estatisticamente entre os grupos comparando-se o número de trabéculas (Tb.N). Apenas uma tendência em que 5LOKO ZL apresentou menor número de trabéculas ósseas comparado ao seu controle 5LOKO (Figura 1D).

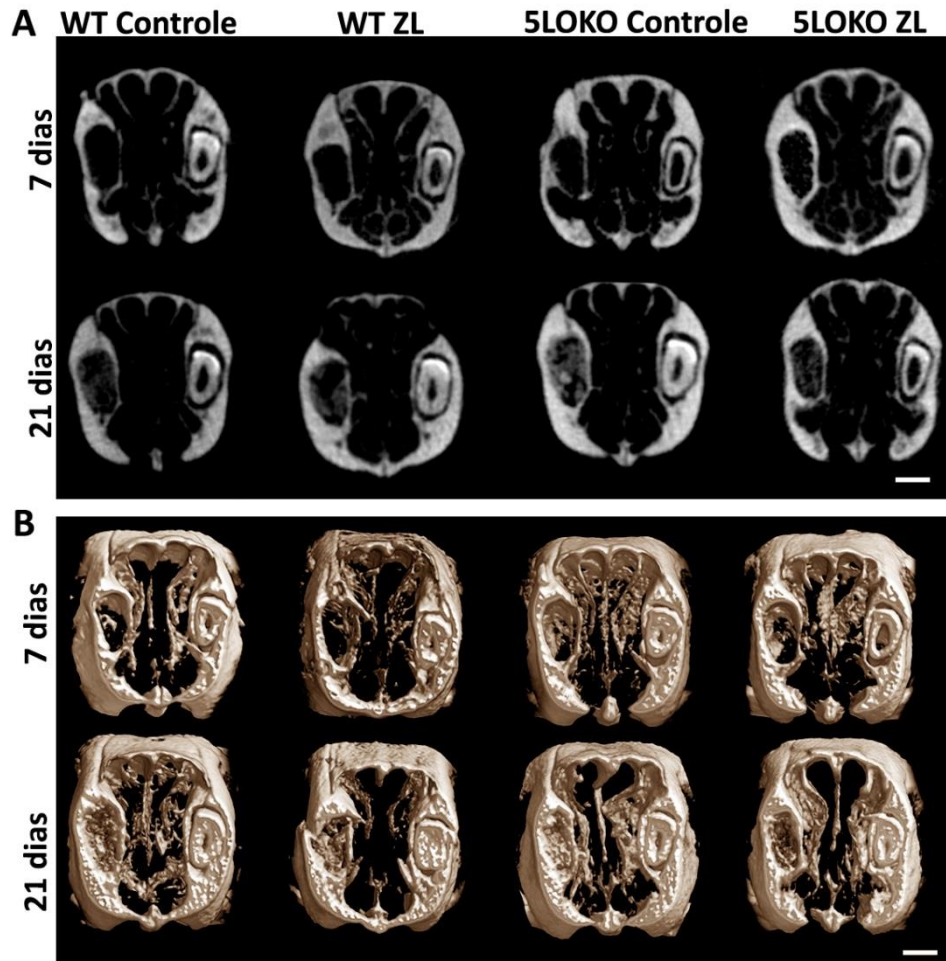
Na análise qualitativa, observou-se maior hiper densidade nos alvéolos dos animais 5LOKO Controle e 5LOKO ZL em comparação aos WT Controle e WT ZL, conforme observa-se na Figura 2.

**FIGURA 1 - Análise microtomográfica dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senescentes WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana).** **A-** BV/TV % (proporção de osso por tecido total); **B-** Tb.Sp (separação ou espaçamento em mm entre as trabéculas ósseas neoformadas); **C-** Tb.Th (espessura em mm de trabéculas ósseas neoformadas); **D-** Tb.N (número de trabéculas ósseas neoformadas). Os gráficos foram plotados no formato boxplot, apresentando valores de máximo e mínimo da distribuição, bem como a mediana. Tabelas adicionais mostram valores de média e desvio padrão. Diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \* contendo os valores de  $p \leq 0.05$ . Grupos com tendência à diferença estatística apresentam apenas os valores de p



Fonte: Autor

**FIGURA 2** - Aspecto de hiperdensidade em imagem 2D (A) e 3D (B) dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senescentes WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana)



Fonte: Autor

#### 4.2 Análise Histopatológica em HE e TG

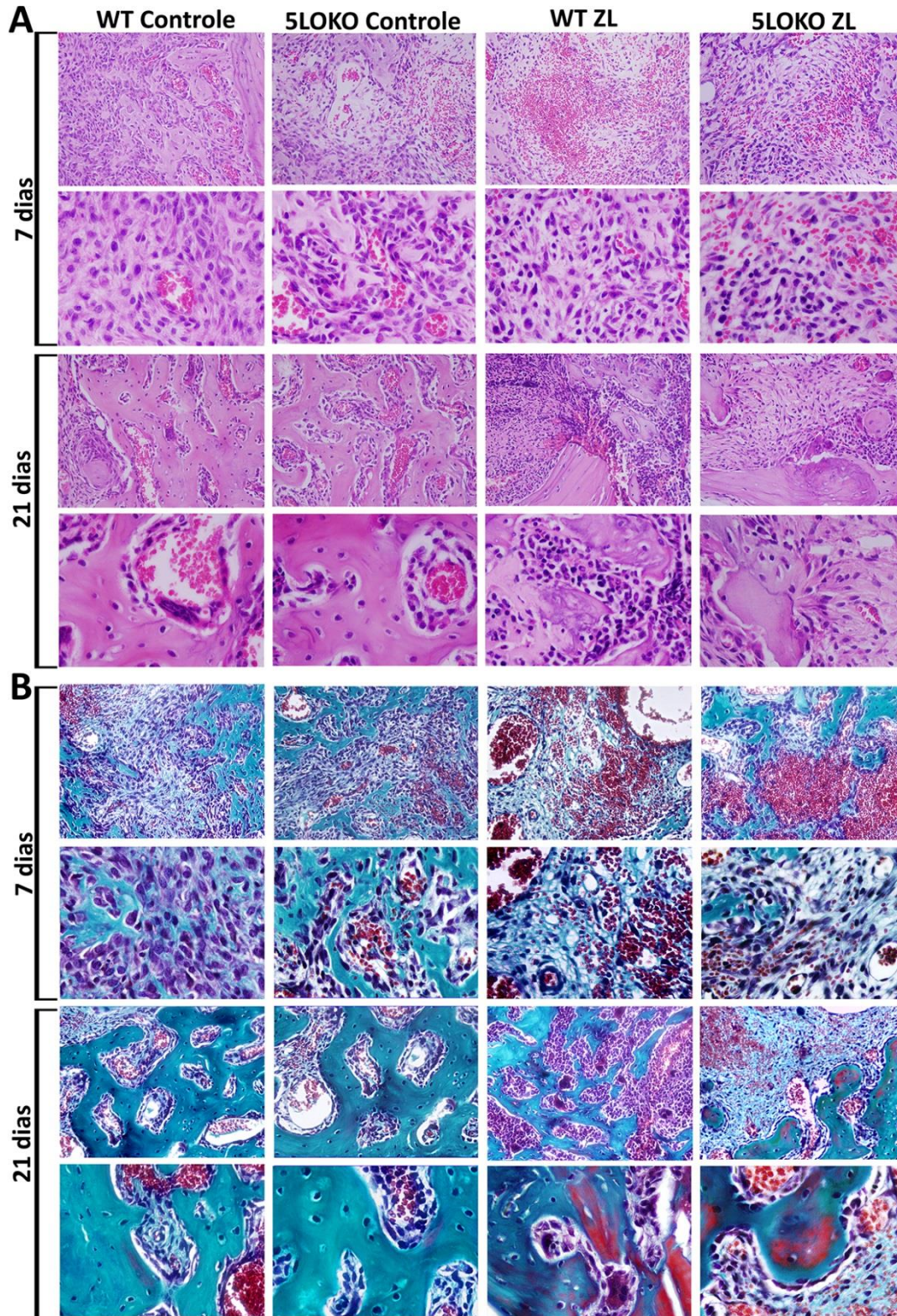
As amostras foram analisadas em corte transversal do centro do alvéolo e visualizadas nos aumentos de 10x e 40x. No grupo controle WT observou-se discreta atividade osteogênica aos 7 dias, seguindo para a formação de trabéculas ósseas regulares e em remodelação aos 21 dias. No grupo 5 LOKO, no período de 7 dias, notou-se maior atividade osteogênica, com produção de matriz óssea. Aos 21 dias, as trabéculas mostram-se maduras e os espaços medulares estabelecidos, com eventuais focos de leucócitos mononucleares. O grupo WT ZL mostrou persistência de coágulo sanguíneo aos 7 dias, em meio ao tecido de granulação. Aos 21 dias observou-se trabéculas ósseas irregulares com numerosas lacunas com ausência de osteócitos, em meio a tecido de granulação infiltrado por leucócitos mononucleares, predominantemente.

Nota-se ainda, presença de osteoclastos grandes e arredondados, não aderidos à superfície óssea. Aos 7 dias, o grupo 5LOKO ZL apresentou eventuais focos de coágulo em meio ao tecido de granulação infiltrado por leucócitos mononucleares, predominantemente. Aos 21 dias, notou-se ora atividade osteogênica com neoformação óssea, ora presença de tecido ósseo não viável e sequestros. Os eventos histológicos estão representados na Figura 3 (HE e TG).

### ***4.3 Análise de Birrefringência***

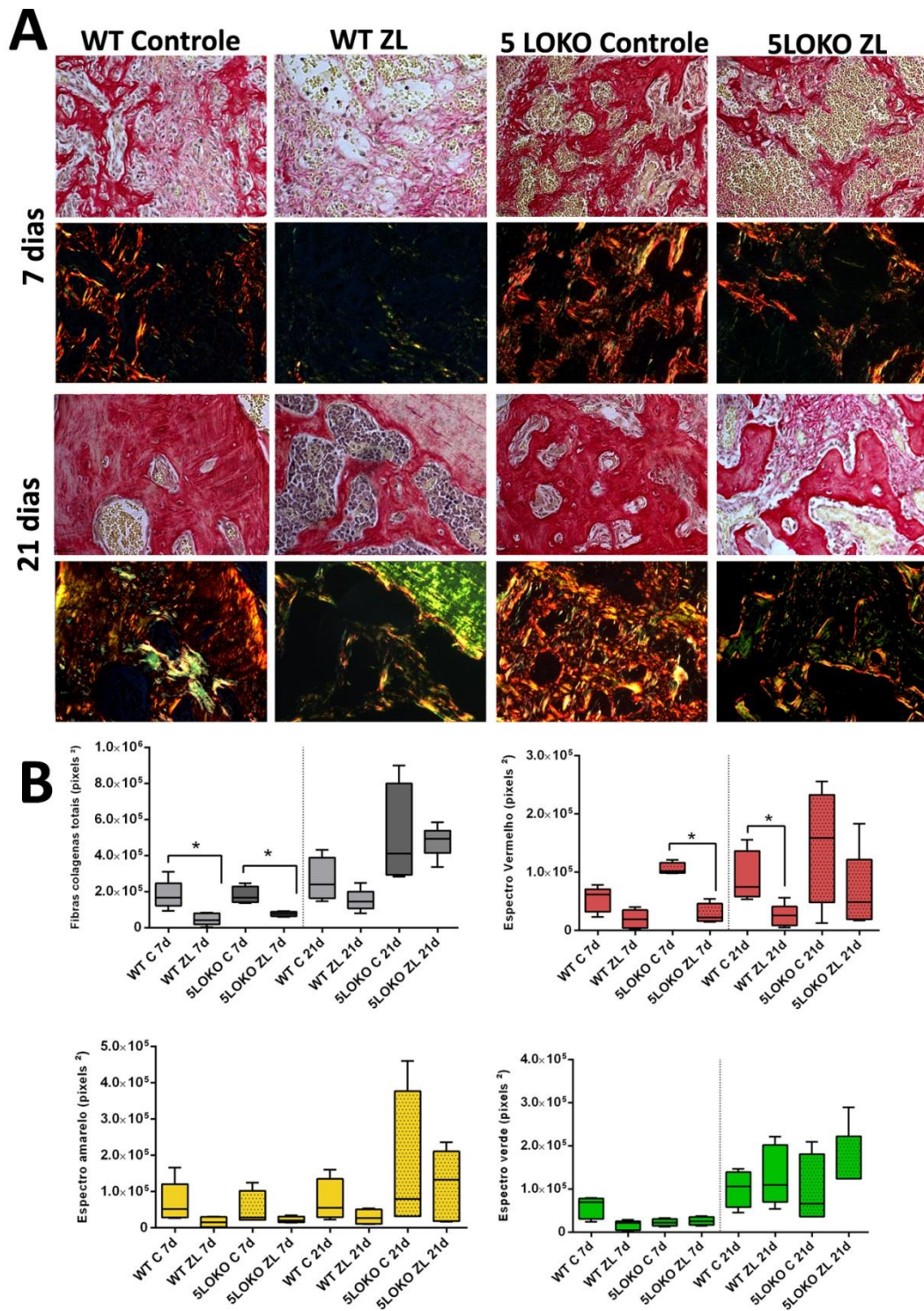
A partir da análise quantitativa das fibras colágenas totais observou-se um aumento significativo nos grupos WT Controle,  $181054 \pm 79366$ , em comparação com WT ZL,  $47876 \pm 33104$ , bem como comparando-se o 5LOKO Controle,  $179049 \pm 47895$ , e 5LOKO ZL,  $76483 \pm 13269$ , no período de 7 dias. No entanto, aos 21 dias, não foram detectadas diferenças entre os grupos. Com relação às fibras evidenciadas pelo espectro vermelho, aos 7 dias observou-se aumento significativo no grupo 5LOKO Controle,  $105761 \pm 10369$ , em comparação com o 5LOKO ZL,  $28161 \pm 17584$ . Já aos 21 dias, somente o grupo WT Controle apresentou um aumento maior no número de fibras,  $89764 \pm 45234$ , em comparação com o WT ZL,  $26553 \pm 18534$ . Não foram detectadas diferenças significativas na análise das fibras evidenciadas pelos espectros amarelo e verde, conforme pode-se observar na Figura 4 (A e B) e Tabela 2.

**FIGURA 3** - Imagens representativas do aspecto histopatológico dos grupos WT, WT-ZL, 5LOKO e 5-LOKO-ZL aos 7 e 21 dias experimentais (HE e TG, aumentos 10x e 100x)



Fonte: Autor

**FIGURA 4 - Análise de birrefringência dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senescentes WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana). A- Imagens comparativas em campo claro e por luz polarizada (aumento 20x). B- Os gráficos demonstram os resultados da análise quantitativa de fibras colágenas totais, e nos espectros vermelho, amarelo e verde. Os gráficos foram plotados no formato boxplot, apresentando valores de máximo e mínimo da distribuição, bem como a mediana. Diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \***



**TABELA 2** - Média e desvio padrão da análise quantitativa de birrefringência

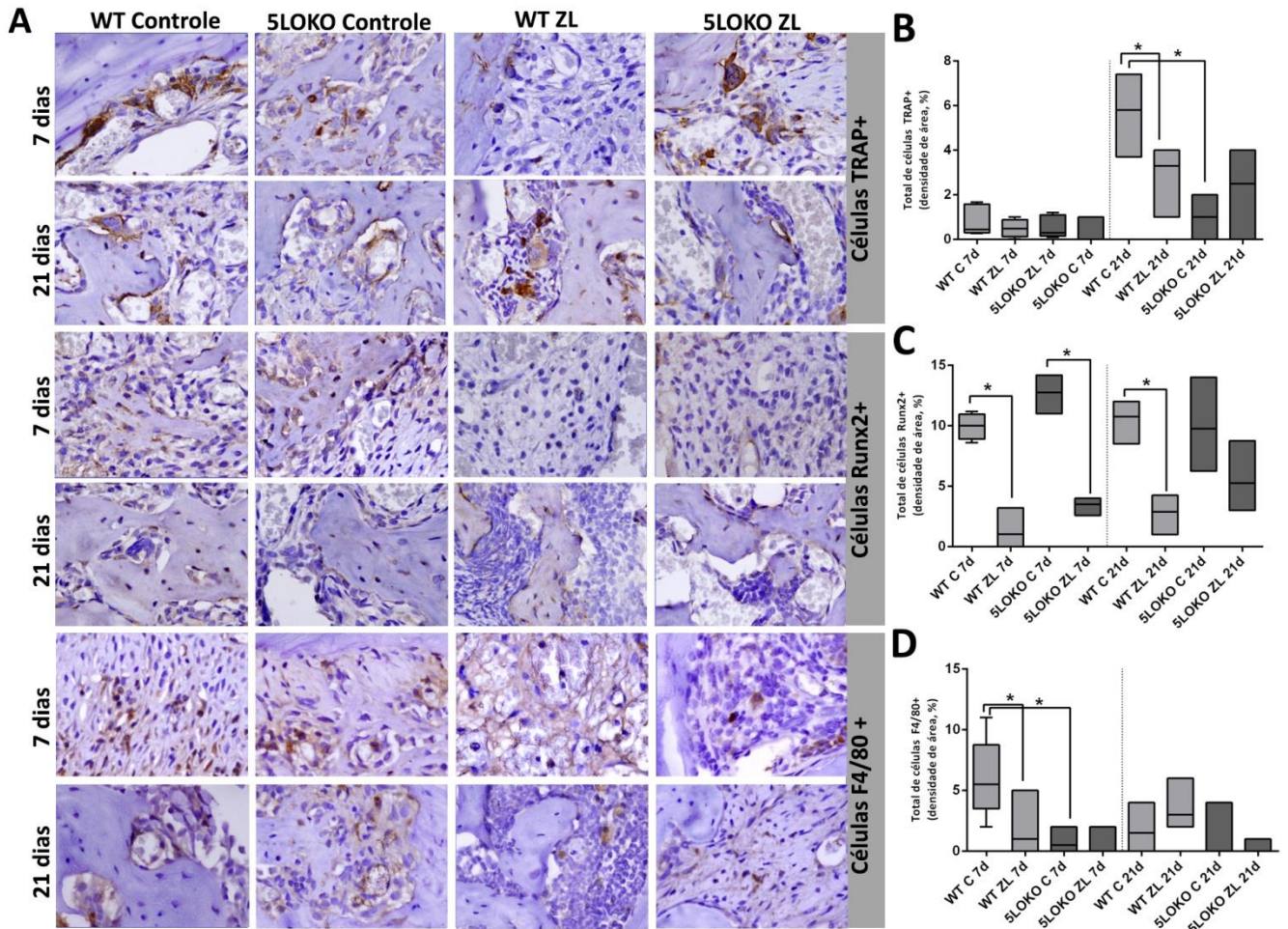
FIBRAS TOTAIS								
	WTc -7d	WTzl – 7d	5LOKOc – 7d	5LOKOzl – 7d	WTc – 21d	WTzl – 21d	5LOKOc – 21d	5LOKOzl – 21d
<b>MÉDIA</b>	181054	47876	179049	76483	264199	152208	501401	479935
<b>DP</b>	79366	33104	47895	13269	121341	61126	282425	89803
FIBRAS VERDES								
	WTc -7d	WTzl – 7d	5LOKOc – 7d	5LOKOzl – 7d	WTc – 21d	WTzl – 21d	5LOKOc – 21d	5LOKOzl – 21d
<b>MÉDIA</b>	57370	16263	22421	25787	101143	127590	94288	163102
<b>DP</b>	24864	11098	8276	9440	42635	69704	81702	71654
FIBRAS AMARELAS69704								
<b>MÉDIA</b>	69991	16080	50868	22536	73292	29824	162802	118305
<b>DP</b>	57023	14210	49644	8662	60025	19084	203141	98311
FIBRAS VERMELHAS								
	WTc -7d	WTzl – 7d	5LOKOc – 7d	5LOKOzl – 7d	WTc – 21d	WTzl – 21d	5LOKOc – 21d	5LOKOzl – 21d
<b>MÉDIA</b>	53693	19532	105761	28161	89764	26553	146592	66094
<b>DP</b>	21411	15962	10369	17584	45234	18534	100437	67930

Fonte: Autor

#### 4.3 Análises Imuno-histoquímicas – Runx2, TRAP e F4/80

A partir da quantificação das células imunomarcadas, observou-se um número maior de células TRAP+ aos 21 dias no grupo WT Controle,  $5,68 \pm 1,575$ , em comparação ao WT ZL, e 5LOKO Controle. Com relação às células Runx-2+, detectou-se aumento significativo entre WT Controle e WT ZL,  $2,9 \pm 1,371$  e entre 5LOKO Controle,  $1 \pm 0,7071$ , e 5LOKO ZL,  $2,167 \pm 1,472$ , aos 7 dias. Aos 21 dias, somente o WT Controle,  $10,5 \pm 1,514$ , mostrou maior número de células Runx-2+ em comparação ao WT ZL,  $2,75 \pm 1,369$ . Não foram identificadas diferenças entre os demais grupos. Já as células F4/80+ foram mais numerosas no grupo WT Controle aos 7 dias  $6 \pm 3,162$ , em comparação ao WT ZL,  $1,909 \pm 1,7$ , e 5LOKO Controle,  $0,7273 \pm 0,827$ . Aos 21 dias, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, conforme observa-se na Figura 5 A-C e Tabela 3.

**FIGURA 5.** A) Imagens representativas das células marcadas positivamente para TRAP, Runx2 e F4/80 pela técnica imuno-histoquímica. B-D) Os gráficos demonstram os resultados da análise quantitativa de das células marcadas positivamente para cada anticorpo. Os gráficos foram plotados no formato boxplot, apresentando valores de máximo e mínimo da distribuição, bem como a mediana. Diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \*



Fonte: Autor

**TABELA 3** - Média e desvio padrão da análise quantitativa das células positivamente marcadas pela técnica imuno-histoquímica para as proteínas TRAP, RUNX-2 e F4/80

		TOTAL DE OC TRAP+							
	WTc	WTzl	SLOKOc	SLOKOzl	WTc	WTzl	SLOKOc	SLOKOzl	
	7d	7d	7d	7d	21d	21d	21d	21d	
MÉDIA	08433	0,4958	0,2004	0,56	5,68	2,9	1	2,167	
DP	06813	0,4038	0,447	0,503	1,575	1,371	0,7071	1,472	
		TOTAL DE CÉLULAS RUNX2+							
	WTc	WTzl	SLOKOc	SLOKOzl	WTc	WTzl	SLOKOc	SLOKOzl	
	7d	7d	7d	7d	21d	21d	21d	21d	
MÉDIA	9,963	1,325	12,68	3,4	10,5	2,75	9,938	5,563	
DP	1,08	1,417	1,36	0,7118	1,514	1,369	3,23	2,453	
		TOTAL DE CÉLULAS F4/80+							
	WTc	WTzl	SLOKOc	SLOKOzl	WTc	WTzl	SLOKOc	SLOKOzl	
	7d	7d	7d	7d	21d	21d	21d	21d	
MÉDIA	6	1,909	0,7273	0,3529	1,625	3,429	0,75	0,1	
DP	3,162	1,7	0,827	0,6063	1,685	1,618	1,183	0,3162	

Fonte: Autor

*DISCUSSÃO*

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos do ZL no processo de reparo de camundongos fêmeas senescentes já foram demonstrados detalhadamente em estudo anterior por este mesmo grupo de pesquisa (BIGUETTI et al., 2019) devido à ausência de investigações pré-clínicas que considerassem as variáveis gênero e idade conjuntamente, consistentes com as condições clínicas favoráveis ao desenvolvimento das OMs. No presente trabalho, comparamos o mesmo modelo experimental com sua variante geneticamente modificada para 5LO, a fim de se investigar os efeitos da inibição desta enzima ao longo do tempo, uma vez que a mesma encontra-se diretamente relacionada aos eventos de osteoclastogênese (BONEWALD et al., 1997).

Considerando-se a saúde geral dos animais, a inibição da 5LO parece não ter interferido negativamente no processo de envelhecimento. Ao contrário, clinicamente os animais apresentaram fenótipo mais robusto em comparação aos WT (dados não apresentados), uma vez que esta inibição resulta em um animal com condições esqueléticas semelhantes à osteopetrose, com menor número de osteoclastos e conseqüentemente, diminuição do turnover ósseo e possibilidade de manutenção de sua massa óssea ao longo do tempo (BONEWALD et al., 1997). Este foi o motivo pelo qual o presente modelo foi eleito para esta investigação. Considerando-se o mecanismo de ação dos BFs nitrogenados na homeostasia dos osteoclastos levando-os à incapacidade de exercer a atividade de reabsorção óssea, e assim, resultando em um tecido ósseo com menor capacidade reacional (ROGERS et al., 2011), a hipótese inicial foi a de que os animais 5LOKO também desenvolvessem a OM após uma injúria na cavidade bucal, uma vez que apresentam características semelhantes, porém, resultantes de diferentes mecanismos (KANG et al., 2015). No entanto, os resultados obtidos apontam para outros efeitos colaterais da droga envolvidos em sua etiopatogenia, sendo que as características do tecido ósseo representam apenas um dos fatores que levam a esta condição patológica, conforme já observado em estudos clínicos e estudos experimentais (KOERDT et al., 2014), por meio de diferentes abordagens.

Durante o processo de reparo, comparando-se os animais WT e 5LOKO Controles pode-se confirmar a capacidade precoce de neoformação óssea também em reparo de osso intramembranoso, tanto pelos resultados da microarquitetura óssea (microCT) quanto pela análise histopatológica e imuno-histoquímica dos alvéolos em reparação. Apesar da não detecção de diferenças significativas no parâmetro BV/TV entre os grupos no período inicial de formação óssea (7 dias), observou-se padrões diferentes entre os grupos. Enquanto que nos animais WT a neoformação óssea se concentrava na periferia dos alvéolos, nos 5LOKO a mesma podia ser observada no interior dos alvéolos, coerentes com a marcação imuno-histoquímica pela proteína Runx-2. Em ambos, a quantidade de fibras colágenas totais foram significativamente maiores que os grupos medicados com o ZL. Tais informações são inéditas, uma vez que a capacidade de reparação óssea acelerada em animais 5LOKO já havia sido identificada por Manigrasso e O'Connor (2010) em estudo sobre o assunto, porém, em modelo de fratura de ossos endocondrais (fêmur).

Especificamente, quando da associação do ZL durante o processo de reparo alveolar, algumas alterações puderam ser observadas. A partir das análises realizadas, pode-se confirmar

quadro compatível com OM nos animais WT ZL respeitando-se as características específicas deste modelo animal, como as diferenças nos aspectos clínicos da mesma quando comparado com as dos humanos, bem como na severidade das lesões, conforme criteriosamente esclarecido em Bigueti et al. (2019).

Assim, a partir das imagens obtidas pelo microCT, pode-se afirmar que o ZL influenciou a qualidade da microarquitetura óssea trabecular, durante o processo de reparo alveolar de forma significativa nos animais WT e 5LOKO, no entanto, de forma mais pronunciada nos WT observada pela deficiência micro arquitetural das trabéculas ósseas mineralizadas, somada à eventuais fraturas patológicas (Figura 2), confirmando uma certa resistência do animal com deficiência para a enzima 5LO aos efeitos da medicação devido, possivelmente, às características inerentes a estes animais conforme já descrito. Enquanto que o grupo WT ZL apresentava atraso evidente no reparo alveolar, associado a intenso infiltrado inflamatório, o 5LOKO ZL exibia inflamação moderada, porém com trabéculas ósseas em fase de maturação no período de 21 dias. Ainda, com relação à qualidade da matriz colagenosa, o grupo 5LOKO e 5LOKO ZL não apresentaram diferenças significativas considerando as fibras de espectro vermelho relacionadas à melhor qualidade da matriz óssea mineralizada.

Com relação às células marcadas positivamente para F4/80, só foram observadas diferenças significativas entre o WT Controle e os grupos WT ZL e 5LOKO Controle no período de 7 dias, sendo maior no grupo WT Controle neste período inicial do reparo, não apresentando diferenças quando comparado com o 5LOKO ZL. Quando da análise das células TRAP positivas, este quadro se manteve, com um número significativamente maior no grupo WT Controle em comparação aos WT ZL e 5LOKO Controle. Tal condição pode encontrar relação a respeito da origem das células osteoclásticas e macrofágicas, refletindo nos períodos mais tardios da reparação óssea (VERMEER et al., 2013).

Apesar destas diferenças, considerando-se os resultados das metodologias adotadas, o fenótipo esquelético osteopetrótico dos animais 5LOKO não parece ser suficiente para o desenvolvimento das OMs relacionadas ao uso do BF ZL, abrindo novas possibilidades de estudo para outros fatores relacionados aos efeitos da droga em nível sistêmico no presente modelo animal.

*CONCLUSÃO*

## **6 CONCLUSÃO**

O processo de reparo em camundongos fêmeas senescentes da linhagem 129/Sv WT e 5LOKO associados ao uso do BF ZL ocorreu de modo distinto, levando a quadro de OM nos animais WT e atraso nos animais 5LOKO, sem sinais histopatológicos que caracterizem a doença. Deste modo, a inibição da enzima 5LO parece influenciar de maneira positiva o processo de reparo ósseo intramembranoso alveolar, mesmo na presença de fenótipo esquelético osteopetrótico, sugerindo outros fatores relacionados à droga que favoreçam o desenvolvimento da OM no presente modelo animal.

*REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS

- Bigueti, C. C., F. Cavalla, E. M. Silveira, A. C. Fonseca, A. E. Vieira, A. P. Tabanez, D. C. Rodrigues, A. P. Trombone and G. P. Garlet (2018). "Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization." *Journal of Applied Oral Science*: 1-24.
- Bigueti, C.C. et al., Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. 2019.
- Bonewald, L.F., The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 2011. 26(2): p. 229-38.
- Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, Dallas MR, Mundy GR, Boyce BF. Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. *Adv Exp Med Biol*. 1997;433:299-302.
- Boros K, Freemont T. Physiology of ageing of the musculoskeletal system. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31(2):203-7.
- Bouxsein, M. L., S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldberg, K. J. Jepsen and R. Muller (2010). "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography."
- Byers, S. L., M. V. Wiles, S. L. Dunn and R. A. Taft (2012). "Mouse estrous cycle identification tool and images." *PLoS One* 7(4): e35538.
- Chapurlat RD, Garnero P, Sornay-Rendu E, Arlot ME, Claustrat B, Delmas PD. Longitudinal study of bone loss in pre- and perimenopausal women: evidence for bone loss in perimenopausal women. *Osteoporos Int*. 2000;11(6):493-8.
- Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone*. 2008;42(5):848-60.
- Cremers SC, Pillai G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(6):551-70.

Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, Roy S. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol*. 2015;185(10):2596-606.

Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. *Bone*. 2014;58:126-35.

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

Gutta R, Louis PJ. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(2):186-93.

Hoefert S, Schmitz I, Weichert F, Gaspar M, Eufinger H. 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*. 2015;19(2):497-508.

Jones CM, Boelaert K. The endocrinology of ageing: a mini-review. *Gerontology*. 2015;61(4):291-300.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010 Jun 29;8(6):e1000412.

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

Koerdt S, Dax S, Grimaldi H, Ristow O, Kuebler AC, Reuther T. Histomorphologic characteristics of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(6):448-53.

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

Loiselle AE, Jiang JX, Donahue HJ. Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone*. 2013;54(2):205-12.

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

Manolagas SC, Almeida M, Jilka RL. Gonadal steroids. IN: Rosen CJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 8th ed. Washington: Wiley-Blackwell; 2009. p. 195-207.

Nakashima T, Takayanagi H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol*. 2009;29(5):555-67.

Partridge L, Deelen J, Slagboom PE. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*. 2018;561(7721):45-56.

Pazianas M et al. *J Natl Cancer Inst*. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages 2011.

Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH, Lundy MW, Henneman ZJ, Nancollas GH, Sun S, Blazewska KM, Bala JL, Kashemirov BA, Khalid AB, McKenna CE, Rogers MJ. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res*. 2010;25(3):606-16.

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

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(5):527-34.

Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res*. 1982;38:457-510.

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

Zhang J, Wang R, Zhao YL, Sun XH, Zhao HX, Tan L, Chen DC, Hai-Bin X. Efficacy of intravenous zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis: a meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(9):743-8.

Vivan, R. R., C. E. Mecca, C. C. Bigueti, A. C. Renno, R. Okamoto, B. C. Cavenago, M. H. Duarte and M. A. Matsumoto (2016). "Experimental maxillary sinus augmentation using a highly bioactive glass ceramic." *J Mater Sci Mater Med* 27(2): 41.

Vermeer J, Renders G, van Duin MA, Jansen I, Bakker LF, Kroon SA, et al. Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Dis*, 2017. 23(1): p. 126–133. Pmid: 27706930.

*Anexos*

## ANEXO A



PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA E  
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) sobre o sistema musculoesquelético: análise comparativa do processo de reparo e senescência dos tecidos ósseo e muscular em camundongos 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO", protocolada sob o CEUA nº 8516040518, sob a responsabilidade de **Mariza Akemi Matsumoto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) na reunião de 26/06/2018.

We certify that the proposal "The role of 5-lipoxygenase (5-LO) on musculoskeletal system: a comparative analysis of healing and senescence of bone and muscular tissues in 129/Sv-WT and 129/Sv 5-LOKO mice", utilizing protocol number CEUA 8516040518, under the responsibility of **Mariza Akemi Matsumoto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 06/26/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [05/2018](#) a [04/2019](#) Área: [Odontologia](#)

Resumo: As interações entre tecido ósseo e muscular esquelético como um sistema (sistema musculoesquelético) vão além de suas funções mecânicas e estruturais, os quais atuam mutuamente na regulação da inflamação, como ocorre no desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento (como osteoporose e sarcopenia), bem como na inflamação que se desenvolve durante a regeneração tecidual após uma injúria. Em ambas as situações, degenerativa ou regenerativa, fatores inflamatórios participam de maneira importante nos tecidos ósseo e muscular. Dentre eles destacam-se as enzimas envolvidas na metabolização do ácido araquidônico, mais especificamente a enzima 5-lipoxigenase (5-LO), a qual tem exibido papel relevante no metabolismo e reparo ósseo, confirmado pelo fenótipo ósseo em modelos animais. Porém, seus efeitos sobre o sistema musculoesquelético permanecem pouco entendidos. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo analisar o papel da 5-LO sobre o tecido ósseo e muscular esquelético em relação ao processo de reparo e senescência, por meio de análises comparativas entre camundongos 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO, machos e fêmeas, em idade adulta (12 semanas) e em senescência (após 64 semanas). Para tanto os animais serão submetidos à injúria cirúrgica no tecido muscular esquelético (masseter e vasto lateral) e no tecido ósseo (mandíbula e fêmur) do lado direito, sendo que o lado esquerdo será utilizado para controle. Após os períodos experimentais de 7 e 21 dias os animais serão eutanasiados e os espécimes removidos para diferentes análises: microCT e análise birrefringência (tecido ósseo), histoquímica para ATPase miosínica (tecido muscular), histopatológica e histomorfométrica (hematoxilina e eosina, tricrômico de Goldner), imunomarcação para diferentes alvo de reparo/regeneração em ambos os tecidos (Runx-2, TRAP, OCN, RANKL, OPG no tecido ósseo; colágeno I, MyoD e/ou Miogenina no tecido muscular), bem como marcadores inflamatórios para metabolismo do ácido araquidônico (COX-2, 5-LO) e para macrófagos (F4/80, CD80 e CD206) em ambos os tecidos. Espécimes adicionais serão coletados para analisar quantitativamente as metaloproteinases 2 e 9, por meio de zimografia, assim como para análise quantitativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-6) por ELISA. Além disso, o tecido ósseo e muscular de outras regiões (ossos coluna vertebral, maxila e crânio, músculos gastrocnêmio e sóleo) serão coletados juntamente com o fêmur e hemi-mandíbula do lado controle, para caracterização do fenótipo tecidual dos diferentes gêneros (macho e fêmea), idades (12 semanas e 64 semanas) e condições experimentais (5-LOKO e WT). Neste sentido, serão também utilizadas microCT (para tecido ósseo), análises histológicas e imuno-histoquímica dos marcadores já citados (além de marcadores de atrofia Atrogenin-1 e MuRF-1 para o tecido muscular), análise histoquímica para ATPase miosínica (tecido muscular) e análises moleculares (zimografia e ELISA). A densidade da massa muscular dos animais nos diferentes grupos será obtida através da mensuração do peso de determinados músculos (gastrocnêmio, masseter e sóleo) em relação ao peso corporal. Por fim, acredita-se que análise conjunta dos resultados deste projeto poderá servir de base para o entendimento dos mecanismos biológicos que regulam a regeneração tecidual e a manutenção da saúde do sistema musculoesquelético com ênfase no papel da enzima 5-LO.

Local do experimento: Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 23 de julho de 2018

## ANEXO B



PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA E  
PÓS-GRADUAÇÃO

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Andréia Silva  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Sagrado Coração