



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

ANDRÉ HERGESEL DE OLIVA

**Processo de reparo alveolar frente à administração de
bifosfonato nitrogenado: avaliação comparativa em
camundongos 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO**

**ARAÇATUBA – SP
2022**

ANDRÉ HERGESEL DE OLIVA

**Processo de reparo alveolar frente à administração de
bifosfonato nitrogenado: avaliação comparativa em
camundongos 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de "Doutor em Odontologia" (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientadora: Profa. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientador: Prof. Assoc. Edilson Ervolino

**ARAÇATUBA – SP
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48p

Oliva, André Hergesel de.

Processo de reparo alveolar frente à administração de bifosfonato nitrogenado : avaliação comparativa em camundongos 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO / André Hergesel de Oliva. - Araçatuba, 2022

40 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Camundongos 2. Regeneração óssea 3. Difosfonatos
I. T.

Black D7

CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dedico este trabalho às pessoas mais importante em minha vida: **à minha família**. Que mesmo morando há centenas de quilômetros de distância se faziam presentes a todo momento durante este período de formação.

Ao meu pai, **(Leonel de Oliva)**, minha grande referência de retidão e visão de mundo, que nunca mediu esforços para a minha educação e crescimento. Obrigado pelo carinho, dedicação e preocupação sempre constante. Te desejo muita saúde para compartilharmos muitos momentos como este. Te amo, pai!

À minha mãe, **(Solange Aparecida Hergesel)**, pelo amor sem medida e por sempre saber a melhor maneira de confortar nos momentos de angústia. Porto seguro e luz que sempre iluminará minha vida. Te amo, mãe!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus** por tornar possível esse momento.

À minha orientadora, **Professora Ass. Mariza Akemi Matsumoto**, por ter me aceitado como seu orientado. Uma pessoa que não mede esforços na ajuda aos semelhantes, um poço de humildade, brandura e conhecimento. Sou imensamente grato pelos seus ensinamentos, sendo, a mim, modelo de orientadora. Muito obrigado por tudo!

Ao meu coorientador, **Professor Assoc. Edilson Ervolino**, por sua disposição em ensinar e ajudar a qualquer momento de necessidade. Muito obrigado por todo amparo!

À **Professora Assoc. Daniela Ponzoni**, a pessoa de grande coração que me iniciou no mundo científico com sua orientação durante a graduação, muito obrigado pela oportunidade!

Ao **Professor Ass. Francisley Avila Souza**, agradeço pelo convívio descontraído e por poder aprender com você. O nome de turma da minha graduação, que nos acompanhou em evolução. Pela possibilidade de operar no hospital e pelo trato descontraído. Estando sempre com alguma piada ou alguma história antiga engraçada para alegrar nossos dias.

À **Professora Ass. Alaíde Gonçalves**, pelas longas conversas no departamento de ciências básicas, sempre trazendo grande informação, conhecimento e humildade. Uma grande pessoa que compartilhei um sentimento de amizade durante minha trajetória no departamento.

Ao **Professor Assoc. Osvaldo Magro Filho**, obrigado pela oportunidade de desenvolver o mestrado e poder chegar hoje aqui.

Ao **Professor Assoc. Idelmo Rangel Garcia Jr. e Professora Assoc. Ana Paula Farnezi Bassi** pelo conhecimento compartilhado com todos do departamento.

À **Professora Ass. Alessandra Marcondes Aranega**, por toda humildade, apoio, respeito e amizade prestados à mim e aos pacientes durante meu período a frente dos caos cirúrgicos do CAOÉ.

Ao **Prof. Dr. André Luis da Silva Fabris**, pela amizade, humildade e simplicidade. Por ser um professor clínico nato, que acredita e confia na capacidade dos alunos e possibilita que os alunos acreditem em si mesmos. Obrigado pelo conhecimento compartilhado durante os plantões.

Ao expoente cirurgião de cabeça e pescoço e dentista cirurgião bucomaxilofacial **Professor Ronaldo Rodrigues de Freitas**, por ter sido seu aluno durante o curso de aperfeiçoamento em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial na Santa Casa de SP. Obrigado pelas explicações, pelas reuniões clínicas, por mostrar a infinidade de conhecimento e responsabilidade que essa área nos exige.

Ao **Professor Me. Thiago Machado**, um grande amigo que a vida me deu. Conte sempre comigo!

Ao **Professor Dr. Fábio Roberto de Souza Batista**, só tenho a agradecer pela parceria e os momentos de risada desde o mestrado.

Ao **Professor Dr. Gabriel Mulinari**, amigo que compartilhou experiências desde os atendimentos cirúrgicos do CAOÉ até momentos de vida!

Ao **Professor Dr. Ciro Duailibe de Deus**, que compartilhou altos e baixos junto comigo durante toda a pós-graduação, cuja amizade foi e continua sendo de grande importância.

Ao **Professor Dr. Gustavo A. Corrêa Momesso**, por ter sido um grande amigo durante a graduação e o contato sempre produtivo que tivemos durante a pós-graduação, refrescando nossa amizade.

Ao **Professor Dr. Silvio Augusto Bellini Pereira**, pelos anos de convívio e grande aprendizagem de vida que me proporcionou com sua amizade desde a graduação.

À **Natiéle Rodrigues Wajima**, por ter estado comigo por momentos difíceis durante o doutorado e pelo apoio sempre prestado.

Ao time de amigos da graduação e pós-graduação orientados da professora Dra. Mariza: **Profa. Me. Nataira R. Momesso, Carol Becher, Me. Ana Carolina Zucon Bacelar, Prof. Me. Ramez H. Mahmoud, Profa. Me. Raquel Parra** e a todos os outros que compartilham ou já compartilharam a orientação da Profa. Mariza, muito obrigado pelos conhecimentos compartilhados e pelo bom convívio. Sendo um agradecimento especial ao **Gustavo Baroni Simionato**, que desenvolveu parte deste trabalho como sua iniciação científica, com contribuição incomensurável, que refletiu na possibilidade de sua execução.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 40, os secretários **André Luís Mattos Piedade e Eliseide Maria Ferreira Silva Navega**, agradeço por todo o convívio fraterno no departamento.

Ao **Sr. Arnaldo**, pelas conversas no horário do café da tarde, pelo exemplo de dedicação e simplicidade que nos dá a cada dia.

A **todos os funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Santa Casa de Misericórdia de Birigui, UNIMED – Araçatuba, NEC e DEFI. Aos pacientes por confiarem suas vidas aos nossos cuidados.

Aos **docentes, funcionários, estagiários e pós-graduandos** do Departamento de Ciências Básicas, Diagnóstico e Cirurgia.

À todas as pessoas envolvidas durante o meu ingresso e período de pós-graduação na Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP.

Agradeço à vida dos animais utilizados durante os experimentos, o que tornou possível a elaboração deste trabalho e permitiu o meu aprendizado.

CAPES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela oportunidade de ser discente de uma instituição tão reconhecida e por onde já passaram grandes nomes da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Diretor Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e Vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, por administrarem honrosamente esta tão querida e eminente unidade unespiana de Araçatuba.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Prof. Associado Wirley Gonçalves Assunção**, pela forma como dirige nossa Pós-Graduação.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, **Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada**, agradeço pela paciência, pelos avisos e e-mails. Vocês são peças fundamentais desta engrenagem. Muito obrigado!

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela prontidão em nos atender

“Conhecer a si mesmo é o caminho mais curto à felicidade.”

(Adaptado da psicografia de Sto Agostinho)

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

RESUMO

A instalação das osteonecroses dos maxilares(OM) tem sido relacionada ao uso crônico de medicamentos antirreabsortivos indicados para doenças e distúrbios do metabolismo ósseo, como os bifosfonatos nitrogenados (nBF), especialmente quando associados a intervenções cirúrgicas-odontológicas. Deste modo, especula-se que a instalação desta doença não ocorre somente devido à condição do tecido ósseo e sua capacidade reacional, mas principalmente pela sua condição de defesa imunológica. O presente estudo tem como objetivo analisar o padrão de reparo ósseo de alvéolos dentários de incisivos superiores recém-extraídos de camundongos 129/Sv geneticamente modificados (*knockouts* – KO) para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO), os quais apresentam fenótipo esquelético osteopetrótico, comparando-os com tipo selvagem (*Wild Type* – WT), com e sem administração de nBF. Para tanto foram utilizados 80 camundongos machos com idades variando entre 8 e 10 semanas, sendo 46 animais 129/Sv WT e 46 animais 129/Sv 5-LOKO, os quais foram submetidos à exodontia do dente incisivo superior direito e divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento: Grupo WT – 0,1 ml de soro fisiológico 0,9%, Grupo WT-ZL – 0,5 mg/Kg de ácido zoledrônico (ZL), Grupo 5-LOKO - 0,1 ml de soro fisiológico 0,9%, Grupo 5-LOKO-ZL – 0,5 mg/Kg de ZL, sendo ambas soluções administradas intraperitonealmente (IP) 1x por semana até o final do experimento. Após os períodos de 7, 14 e 30 dias, cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para remoção das maxilas direitas contendo os alvéolos para as análises histopatológica, histomorfométrica e imuno-histoquímica para COX-2, OPG, RANKL e TRAP. Os resultados não mostraram diferença significativa para a quantidade de matriz óssea entre os grupos WT, KO e WT-ZL. Contudo, foi observado que o grupo KO-ZL apresentou significativamente menos matriz óssea em todos os períodos quando comparado com WT-ZL, além de maior quantidade de células inflamatórias no 14 e 30 dias. Observou-se aumento significativo de células COX-2+ no grupo WT aos 14 dias em comparação com os demais. Detectou-se aumento de OPG ao final do reparo em todos os grupos. Aumento significativo de RANKL foi observado no grupo KO aos 7 dias, em

comparação com 5-LOKO, sendo que ao final do reparo WT-ZL mostrou células RANKL+ significativamente elevadas em comparação com WT e KO-ZL. No entanto, somente aos 14 dias observou-se aumento significativo de células TRAP+ nos grupos WT e WT-ZL em comparação com KO e KO-ZL. A partir destes resultados, pode-se concluir que os animais 5-LOKO apresentaram formação óssea precoce em alvéolos dentários pós-exodontia comparados com os animais WT. No entanto, os efeitos do ZL foram mais deletérios nos camundongos 5-LOKO, possivelmente pela influência da droga e efeitos da inibição desta enzima nos eventos inflamatórios no curso do reparo.

Palavras-chave: Bisfosfonatos. Camundongos. 5-Lipoxigenase. Regeneração óssea.

Oliva AH. Alveolar bone repair of mice under administration of bisphosphonate containing nitrogen: comparative investigation between 129/Sv-WT and 129/Sv 5-LOKO [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

ABSTRACT

Osteonecrosis of the jaws has been related to the chronic use of antiresorptive drugs indicated for diseases and disorders of bone metabolism, such as nitrogenous bisphosphonates (nBP), especially when associated with surgical-dental interventions. Thus, it is speculated that the onset of this disease does not occur only due to the condition of the bone tissue and its reactive capacity, but mainly due to its immunological defense condition. The present study aimed to analyze the bone repair pattern of dental alveoli of maxillary incisors recently extracted from 129/Sv 5-LOKO mice, which had an osteopetrotic skeletal phenotype, comparing them with wild type, 129/Sv WT, with and without administration of nBP. For that, 80 male mice were used with ages varying between 8 and 10 weeks, being 46 animals 129/Sv WT and 40 animals 129/Sv 5-LOKO, which were submitted to the extraction of the upper right incisor tooth and divided into four groups of according to treatment: WT Group - 0.1 ml of 0.9% saline solution, WT-ZL Group - 0.5 mg/Kg of zoledronic acid, Group 5-LOko - 0.1 ml of 0.9 saline solution %, Group 5-LOko-ZL – 0.5 mg/Kg of zoledronic acid, both solutions being administered intraperitoneally (IP) 1x a week until the end of the experiment. After periods of 7, 14 and 30 days, five animals from each group were euthanized to remove the right jaws containing the alveoli. They were immediately fixed in order to be prepared for the following methodological procedures: histotechnical processing for making histological slides stained with hematoxylin and eosin and immunohistochemical. No significant difference was found for the amount of bone matrix between the WT, KO and WT-ZL groups. However, it was observed that the KO-ZL group presented significantly less bone matrix in all periods when compared to WT-ZL, in addition to a greater amount of inflammatory cells at 14 and 30 days. There was a significant increase in COX-2+ cells in the WT group at 14 days compared to the others. An increase in OPG was detected at the end of the repair in all groups. Significant increase in RANKL was observed in the KO group at 7 days, compared to 5-LOKO, and at the end of repair WT-ZL showed significantly elevated RANKL+ cells compared to WT and KO-ZL. However, only at

14 days there was a significant increase in TRAP+ cells in the WT and WT-ZL groups compared to KO and KO-ZL. From these results, it can be concluded that 5-LOKO animals showed early bone formation in post-extraction tooth sockets compared to WT animals. However, the effects of ZL were more deleterious in 5-LOKO mice, possibly due to the influence of the drug and the effects of inhibition of this enzyme on inflammatory events in the course of repair.

Keywords: Mice. Bone regeneration. Bisphosphonates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reconstrução de MicroCT de fêmures de camundongos	18
Figura 2 -	Farmacoterapia e exodontia	20
Figura 3 -	Imagens representativas histológicas	26
Figura 4 -	Mensuração da área de vasos sanguíneos	28
Figura 5 -	Mensuração da área de fibroblastos	28
Figura 6 -	Mensuração da área de fibras colágenas	29
Figura 7 -	Mensuração da área da matriz óssea	29
Figura 8 -	Mensuração da área de osteócitos	30
Figura 9 -	Mensuração da área de lacunas vazias	30
Figura 10 -	Mensuração da área de osteoblastos	31
Figura 11 -	Mensuração da área de osteoclastos	31
Figura 12 -	Mensuração da área de osteoclastos desaderidos	32
Figura 13 -	Mensuração da área de células inflamatórias	32
Figura 14 -	Mensuração da área de coágulo sanguíneo	33
Figura 15 -	Mensuração da área de outros elementos	33
Figura 16 -	Imagens imuno-histoquímicas representativas para COX-2	35
Figura 17	Média dos scores para COX-2	36
Figura 18	Imagens imuno-histoquímicas representativas para OPG	37
Figura 19	Média dos scores para OPG	38
Figura 20	Imagens imuno-histoquímicas representativas para RANKL	39
Figura 21	Média dos scores para RANKL	40
Figura 22	Imagens imuno-histoquímicas representativas para TRAP	41
Figura 22	Média dos scores para TRAP	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido 19

LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ Micrograma por quilograma por dia
 μm Micrômetro
 μm^2 Micrômetro quadrado
Al Alumínio
ALP Fosfatase Alcalina
nBF Bifosfonatos nitrogenados
BV Volume ósseo
BV/TV Percentual de volume ósseo
iBS Sialoproteína óssea
KO Knockout
ml Mililitro
mm Milímetro
 mm^3 Milímetros cúbicos
N Newton
nBPs Bifosfonatos nitrogenados
no Número
OC Osteoclastos
OCN Osteocalcina
OM dos Maxilares
OPG Osteoprotegerina
PTH Paratormônio
RANKL RANK-Ligante
Tb.N Número de trabéculas
Tb.Sp - Separação entre as trabéculas
Tb.Th - Espessura trabecular
TRAP Fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico
VEGF Fator de Crescimento Vascular Endotelial
vs versus
ZL Zoledronato
 μA Microampére

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 MATERIAL E MÉTODO	18
2.1 Validação do modelo animal	18
2.2 Modelo Experimental	19
2.3 Procedimento cirúrgico	19
2.4 Eutanásia	21
2.5 Procedimentos histotécnicos	21
2.6 Análise histopatológica	21
2.7 Técnica imunoistoquímica	21
2.8 Análise histomorfométrica	22
2.9 Análise estatística	23
3 RESULTADOS	24
3.1 Análise microscópica histológica	24
3.1.1 Descrição morfológica qualitativa	24
3.1.2 Descrição morfológica quantitativa	26
3.2 Análise imuno-histoquímica	34
3.2.1 1 Descrição imuno-histoquímica semiquantitativa	34
4 DISCUSSÃO	42
5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

Atualmente não há dúvidas sobre a relação entre o uso crônico de bifosfonato nitrogenados (nBFs) e a instalação das osteonecrose dos maxilares (OM), especialmente no que diz respeito ao mecanismo de ação desta classe de medicamentos sobre as células do tecido ósseo, resultando em diminuição no ritmo de remodelação do mesmo. Sabe-se que os osteoclastos (OCs) são as principais células-alvo da ação dos nBFs, os quais atuam interferindo na organização do seu citoesqueleto e impedem a formação da borda corrugada pela via mevalonato [1]. Deste modo, não há a formação do compartimento de reabsorção celular, o que leva as células à apoptose [2]. No entanto, evidências têm revelado que efeito contrário, anti-apoptótico, é exercido pelos nBFs sobre os osteócitos [3, 4]. Como consequência, os osteócitos perecem por senescência e por acúmulo de danos, não sendo repostos pelo déficit na remodelação óssea instalada [5].

Apesar das claras evidências sobre a ação dos nBFs sobre as células ósseas, recentes investigações tem apontado para outras atuações deste grupo de drogas levando-se em conta a heterogeneidade existente entre as células OCs localizadas em diferentes ossos do esqueleto (ossos de origem endocondral e intramembranosa), bem como a influência dos nBFs nas células do sistema imunológico [6, 7], especialmente com as células do sistema mononuclear fagocitário, monócitos e macrófagos, os quais se encontram suprimidos em locais de OM induzida por uso de bifosfonatos [8]. De fato, sabe-se que o sistema imune exerce um papel importante sobre a homeostasia do tecido ósseo, atuando na regulação das células ósseas por meio da produção de citocinas pró e antiinflamatórias por macrófagos e linfócitos.

Há tempos sabe-se que os produtos gerados durante o processo inflamatório têm uma influência no reparo de feridas ósseas, especialmente no que se refere à ação das prostaglandinas (PGE₂) sobre os osteoblastos, as quais são produtos das enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) na metabolização do ácido araquidônico [9, 10]. Adicionalmente, a enzima 5-lipoxigenase (5-LO) também atua na metabolização do ácido araquidônico, catalisando a conversão desse substrato em dois grupos principais de leucotrienos: LTB₄ e cistenil leucotrieno (CysLT), os quais atuam via dois receptores acoplados à proteína G. Uma das funções do receptor-1 de CysLT

(LTR1) é a indução do sinal de Ca^{2+} intracelular. No início da osteoclastogênese, o RANKL aumenta a concentração de Ca^{2+} no interior das células precursoras dos OCs, ativando o fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), principal fator de transcrição dos genes osteoclásticos, pela fosfatase calcineurina e deste modo, regulando a formação dos OCs via sinalização deste íon [11]. Sugere-se ainda que a inibição medicamentosa da via COX desviaria a metabolização do ácido araquidônico para a via 5-LO, produzindo altos níveis de leucotrienos [12]. Apesar da falta de informações sobre a influência da 5-LO no metabolismo ósseo em condições fisiológicas, evidências sugerem que os leucotrienos gerados a partir desta enzima estimulem a atividade dos OCs [13]. De modo interessante, a COX-2 e a 5-LO exercem efeitos opostos, considerando-se a COX-2 essencial para a reparação óssea e a 5-LO deletéria para este processo.

Tais informações a respeito da 5-LO sobre o reparo ósseo confirmam os achados de Bonewald *et al.* [14] e Manigrasso e O'Connor [15] em estudos realizados com camundongos knockout para 5-LO (5-LOKO), os quais revelaram o fenótipo ósseo destes animais com importante espessamento da cortical e processo de reparo mais acelerado de fratura de fêmur, respectivamente.

A supressão osteoclástica exercida pelos bifosfonatos é apontada como principal fator, dentre sua etiologia multifatorial, para a instalação de OM. Porém, a condição de déficit da atividade ou gênese de osteoclastos, não é exclusiva da ação dos bifosfonatos. Algumas condições sistêmicas de causa genética, como a osteopetrose congênita, reproduzem o déficit de osteoclastos, bem como a redução da capacidade do turnover ósseo, sem, contudo, apresentar OM como risco iminente [16].

O perfil osteopetrótico dos camundongos knockout para enzima 5-LO ocorre, pois, esta enzima é responsável pela via que, a partir de seus subprodutos, resulta na osteoclastogênese, como descrito anteriormente [11]. Desta forma, a deleção genética desta enzima prejudica a formação de osteoclastos, podendo, supostamente, reproduzir um dos fatores causais da OM e sua influência no reparo ósseo. Este modelo animal, portanto, permite a análise da resposta de ossos de fenótipo osteopetrótico frente a uma injúria dento-alveolar, podendo submetê-los à terapia antirreabsortiva a fim de se observar o padrão de resposta inflamatória local,

susceptibilidade ao desenvolvimento de OMs e influência no curso do processo de reparo.

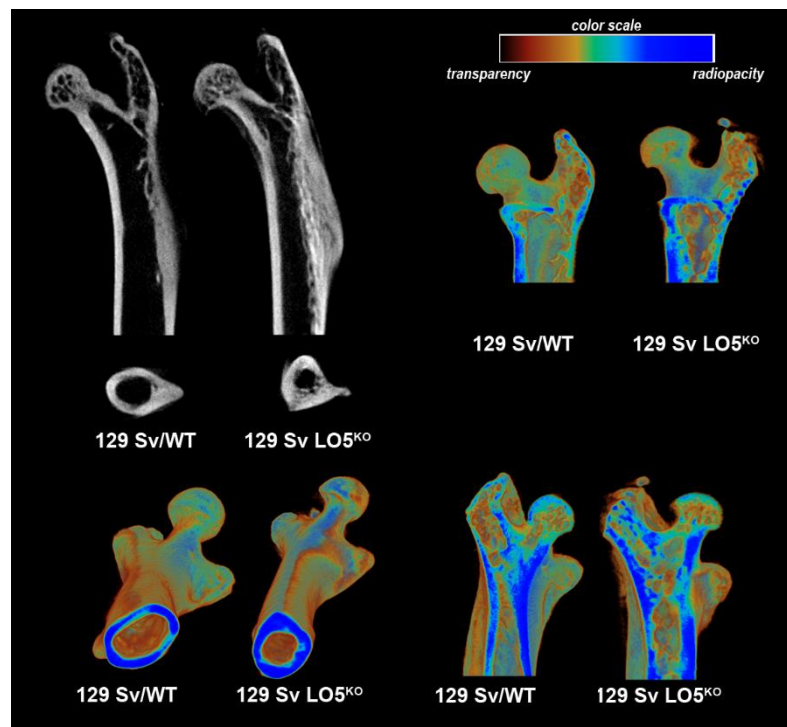
O presente estudo teve como objetivo analisar o padrão de reparo ósseo de alvéolos dentários de incisivos superiores recém-extraídos de camundongos com fenótipo normal (129/Sv-WT) e osteopetrótico (129/Sv 5-LOKO), com e sem administração de nBF.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Validação do modelo animal

Previamente foi realizado um estudo piloto para confirmação do desenvolvimento do perfil ósseo osteopetrótico esperado para os animais 129/Sv 5-LOKO. A partir da análise de MicroCT, como visto na Figura 1, foi possível observar o aumento de massa óssea, tanto da espessura trabecular quanto cortical, confirmando osteopetrose nesses animais e validando o modelo animal para a premissa do estudo.

Figura 1 - Reconstrução de MicroCT de fêmures de camundongos



A reconstrução microtomográfica compara a massa óssea cortical e trabecular entre fêmures de animais da linhagem 129 Sv/WT (selvagem) e 129/Sv 5-LOKO.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

2.2 Modelo experimental

Para a presente pesquisa, serão utilizados um total de 60 camundongos (30 da linhagem 129/Sv 5-LOKO e 30 da linhagem 129/Sv-WT) machos com idade entre 8 e 10 semanas, peso médio de 28 gramas, a serem divididos em 4 grupos distintos e analisados em quatro períodos experimentais (n=5 por grupo para os períodos de 7, 14 e 30 dias), de acordo com a Tabela 1. 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. O ácido zoledrônico foi aplicado via intraperitoneal na dose de 0,5mg/Kg (500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), uma vez por semana, iniciando-se 4 semanas antes da exodontia do incisivo superior direito e persistindo até a eutanásia.

Tabela 1 - Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido

Identificação do grupos	n	Tratamento
Grupo WT	20	129/Sv-WT – 0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP 1x por semana
Grupo WT-ZL	20	129/Sv-WT – 0,5 mg/Kg IP de ácido zoledrônico 1x por semana
Grupo KO	20	129/Sv 5-LO ^{KO} - 0,05 ml de soro fisiológico 0,9% IP 1x por semana
Grupo KO-ZL	20	129/Sv 5-LO ^{KO} – 0,5 mg/Kg ⁻¹ ácido zoledrônico IP 1x por semana

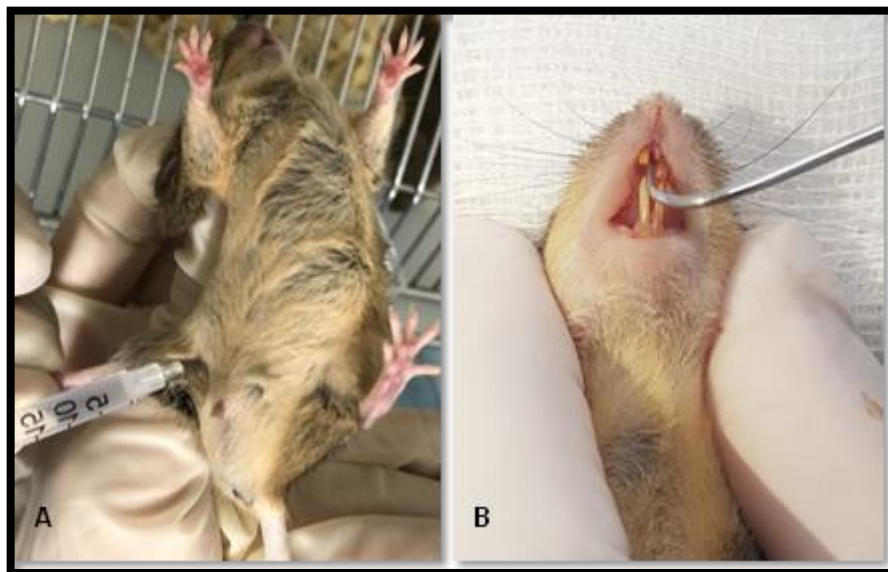
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

2.3 Procedimento cirúrgico

Inicialmente os animais foram submetidos à sedação profunda administrada via intraperitoneal (IP), utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina (80-100 mg/kg Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg- Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Procedeu-se a antisepsia 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 Hollembeck número 3s. Com pinça adaptada para este modelo animal, o dente foi luxado e extraído. Posteriormente, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico 0,9% estéril (Figura 1). 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 onde receberão fosfato de codeína (Codein®, Cristália, SP, Brasil) na dose de 50mg/Kg a cada 4 horas por três dias, por via subcutânea. Os animais foram divididos em quatro grupos distintos de acordo com o tipo de tratamento como mostra a Tabela 1.

Figura 2 - Farmacoterapia e exodontia



Em **A.** Administração semanal de ZL via IP; **B.** Luxação com sonda exploradora adaptada para realizar exodontia do incisivo superior direito com pinça clínica.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

2.4 Eutanásia

Os animais foram selecionados ao acaso em número de 5 por grupo nos períodos de 7 e 14 e 30 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.

2.5 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 apresentem 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 sagital, utilizando-se micrótomo Leica RM. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e cortes de 3 µm de espessura para técnica imuno-histoquímica.

2.6 Análise histopatológica

A análise qualitativa dos alvéolos dentários foi feita em todos os cortes corados em HE, 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.

2.7 Técnica imunohistoquímica

Para a determinação dos padrões moleculares da região de reparo ósseo foram padronizados os anticorpos para a caracterização da capacidade osteogênica

e osteoclastogênica, bem como a qualidade do tecido ósseo por meio de marcação imunohistoquímica do fator de transcrição TRAP e o balanço da remodelação óssea pela marcação de RANKL e OPG, além da marcação da enzima COX-2 mostrando atividade celular de potencial inflamatório. Para tanto, cortes de 3 µm foram tratados com proteinase K por 30 minutos em temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foram utilizados os anticorpos primários policlonais 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, estas foram submetidas a análise semi-quantitativa. Foram realizadas fotomicrografias de cerca de 8 campos de cada alvéolo em objetiva de 40, a partir das quais foram realizadas análises semi-quantitativas, considerando-se os seguintes escores: 0 = ausência de células imunomarcadas; 1 até 25% do campo contendo células imunomarcadas; 2 = entre 25% e 50% do campo contendo células imunomarcadas; 3 = mais de 75% do campo contendo células imunomarcadas, e 4 = 100% do campo com células imunomarcadas [17].

2.8 Análise histomorfométrica

A análise quantitativa dos alvéolos dentários foi feita em todos os cortes corados em H.E., sendo capturados 8 campos em objetiva de 100x de cada alvéolo. Para se realizar a histomorfometria foi determinado um retículo no software ImageJ contendo 120 pontos, a fim de se quantificar: fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, matriz óssea, osteócitos e lacunas, osteoclastos, osteoblastos e leucócitos.

2.9 Análise estatística

Os testes estatísticos da análise qualitativa histométrica e da análise semi-quantitativa imunohistoquímica foram realizados no software GraphPad Prism® 7.04 (La Jolla, CA, USA). Para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos, foram aplicados os testes de normalidade e homoscedasticidade (Shapiro-Wilk). Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste One-Way ANOVA, seguidos do pós-teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise microscópica histológica

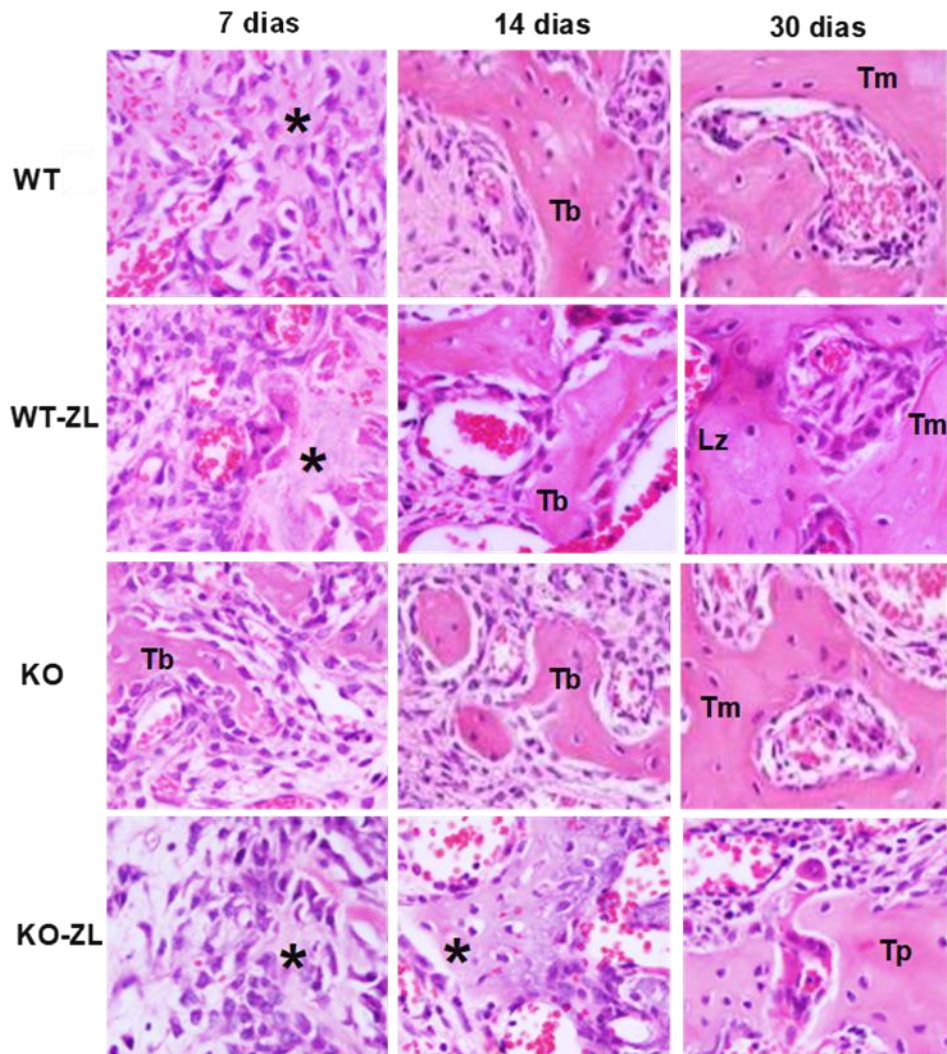
3.1.1 Descrição morfológica qualitativa

O reparo ósseo do grupo WT foi observado a partir do primeiro período (7 dias), onde notou-se formação óssea e osteóide nas paredes do alvéolo e o centro do defeito com predominância de tecido de granulação e osteoblastos associados à matriz mineralizada irregular, demonstrando atividade osteogênica. No período de 14 dias houve formação de trabéculas ósseas primárias, ricas em osteócitos e osteoblastos em atividade na superfície óssea. Avançando para o último período (30 dias), observou-se trabéculas ósseas maduras com células de revestimento ósseo bem definidas em seu entorno e espaços medulares delineados. A associação com bifosfonatos (grupo WT-ZL), aos 7 dias, evidenciou regiões com matriz óssea definida e preenchida com lacunas de osteócitos coexistindo com áreas de matriz óssea irregular e osteoblastos circunjacentes cuja morfologia poderia se apresentar colunar ou irregular. Aos 14 dias do grupo WT-ZL, as trabéculas apresentavam-se delineadas, porém com lacunas acelulares. Os osteoclastos presentes demonstravam aspecto arredondado, desacoplados da superfície óssea, irregulares e sem formação da borda corrugada. Um moderado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (MN) foi observado. No período de 30 dias as trabéculas ósseas eram mais evidentes, porém marcadas por regiões centrais com lacunas osteocíticas não delineadas e vazias, cujo tamanho variava, bem como linhas de reversão irregulares. O infiltrado inflamatório persistiu neste período, porém com polimorfonucleares (PMN) neutrófilos.

Aos 7 dias o grupo KO apresentou trabéculas mais definidas quando comparado com o grupo WT, apesar de delgadas e entremeadas por células osteoblásticas em meio ao tecido conjuntivo frouxo. Eventualmente, a matriz óssea mostrava-se nitidamente desorganizada. Aos 14 dias, as trabéculas ósseas mostravam-se regulares, tornando-se maduras aos 30 dias. Por toda a extensão do alvéolo foi possível notar infiltrado inflamatório MN e PMN difuso, persistente aos 30 dias. Aos 7 dias, o grupo KO-ZL apresentava atividade osteogênica com deposição de matriz irregular em meio a focos de coágulo. De permeio notou-se infiltrado inflamatório difuso MN e PMN. No período de 14 dias já se observam trabéculas

regulares localizadas nas paredes dos alvéolos, ora com osteócitos evidentes, ora com lacunas pequenas e vazias, em meio a tecido de granulação com focos de infiltrado predominantemente MN. A matriz apresenta numerosas linhas de reversão irregulares, bem como discretas áreas semelhantes à “algodão”. Aos 30 dias, observou-se trabéculas ósseas em sua maioria ainda primárias e irregulares, ricas em osteócitos aprisionados em grandes lacunas. Observam-se osteoclastos ora aderidos à superfície óssea, ora arredondados e não aderidos à matriz. Focos de leucócitos MN e eventuais PMNs também estavam presentes. Detalhes da análise histopatológica podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Imagens representativas histológicas



Aos 7 dias observa-se atividade osteogênica (*) nos grupos WT, WT-ZL e KO-ZL. Já no KO, as trabéculas mostram-se regulares (Tb). Aos 14 dias tem-se trabéculas regulares (Tb) nos grupos WT, WT-ZL e KO, enquanto que o grupo KO-ZL ainda se apresenta em atividade osteogênica. Aos 30 dias, os grupos WT, WT-ZL e KO apresentavam um osso trabeculado maduro (Tm), porém, no grupo KO-ZL estava presente trabéculas ainda primárias (Tp). Além disso, para o grupo WT-ZL chama-se atenção para as lacunas vazias (Lz). Coloração das lâminas por hematoxilina e eosina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

3.1.2 Descrição morfológica quantitativa

Para os animais do grupo WT, ao avaliar a quantidade de fibroblastos no período de 7 dias, foi notado que o grupo KO apresentou um aumento estatisticamente significativo da quantidade dessas células no mesmo período. Além disso, houve diferença estatisticamente significativa entre WT e WT-ZL no período de 30 dias com relação ao nível elevado de osteoclastos aderidos nos animais WT-

ZL e também se observou diferença estatisticamente significativa com relação aos níveis de células inflamatórias entre WT e WT-ZL no período de 14 dias, com maiores níveis no grupo WT, e entre os animais WT 30 dias e KO 30 dias, com níveis elevados para o grupo KO. Por fim, foram conservados os níveis de vasos sanguíneos, fibras, matriz óssea, osteócitos, lacunas vazias, osteoblastos, osteoclastos não aderidos, coágulo e outros do grupo WT.

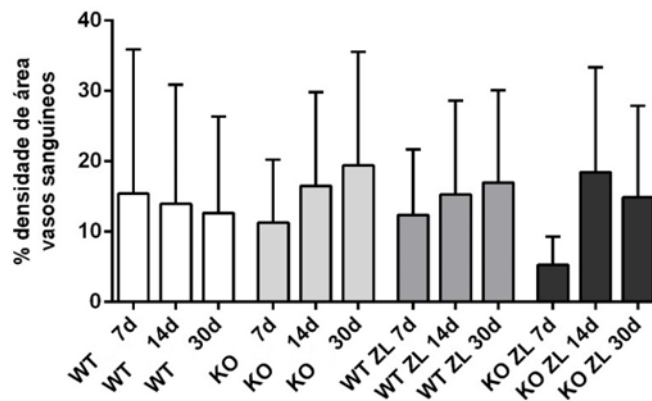
O grupo de animais WT-ZL foi o que apresentou maiores diferenças estatisticamente significantes, podendo ser citado um baixo nível de fibroblastos quando comparado WT-ZL 7 dias e KO-ZL 7 dias (Figura 5); níveis elevados de matriz óssea quando comparado todos os períodos do WT-ZL e KO-ZL; alto nível de osteoblasto quando confrontado o grupo WT-ZL e KO-ZL aos 7 dias; níveis aumentados de osteoclastos aderidos aos 30 dias na comparação entre WT-ZL e WT; níveis baixos de células inflamatórias na comparação de WT-ZL e WT; e WT-ZL vs KO-ZL, ambos aos 14 dias e por último, baixos níveis da categoria "outros" quando na comparação entre WT-ZL vs KO-ZL em ambos os períodos de 14 e 30 dias. Nas demais categorias (vaso sanguíneos, fibras, osteócitos, lacunas vazias, osteoclasto desaderido e coágulo) os níveis foram conservados quando confrontados com os outros grupos de animais.

Os resultados apresentados pelo grupo KO revelam que houve diferença estatisticamente significativa com baixos níveis de fibroblastos quando comparados aos animais KO-ZL no período de 7 dias; níveis elevados de fibras quando confrontados com KO-ZL no período de 7 dias; elevada porcentagem de matriz óssea a partir da comparação com o grupo KO-ZL aos 14 dias; e elevados níveis de células inflamatórias na comparação com o grupo WT no período de 30 dias. Para os outros parâmetros, foram conservados os níveis durante os três períodos.

Por fim, temos que os resultados do grupo KO-ZL revelaram diferenças estatisticamente significantes com elevados níveis de fibroblastos aos 7 dias quando comparado aos grupos KO e WT-ZL; baixa quantidade de fibras aos 7 dias e maior número de fibras aos 30 dias quando confrontado com o grupo KO; baixos níveis de matriz óssea aos 7, 14 e 30 dias na comparação com os grupos WT-ZL, KO e WT-ZL, respectivamente e altos níveis aos 14 dias comparado ao grupo WT-ZL; baixos níveis de osteoblastos aos 7 dias quando comparado ao outro grupo de animais medicados (WT-ZL); altos níveis de células inflamatórias aos 14 e 30 dias na

comparação com os mesmos períodos do grupo WT-ZL. Os demais parâmetros não citados com diferença estatisticamente significativa, mantiveram os níveis entre os outros grupos. Os gráficos representativos dos resultados estatísticos referentes aos parâmetros analisados podem ser observados nas Figuras de 4 a 15.

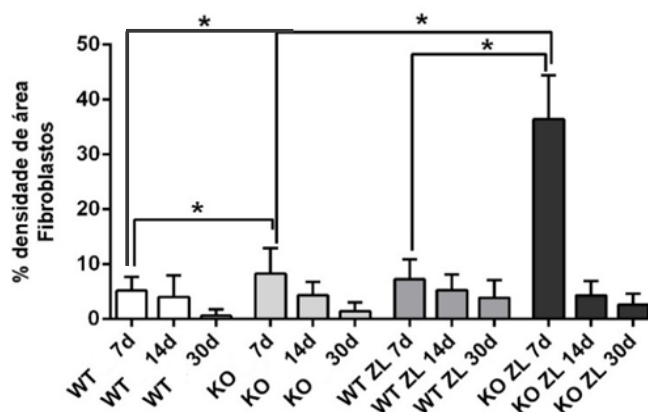
Figura 4 – Mensuração área de vasos sanguíneos



Porcentagem da densidade de área de vasos entre os grupos e seus períodos.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

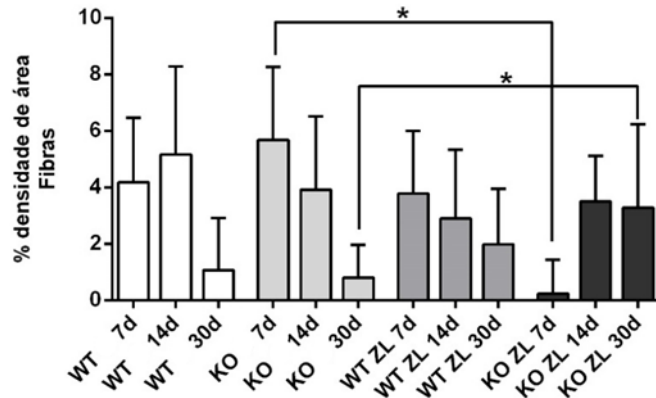
Figura 5 – Mensuração da área de fibroblastos



Porcentagem da densidade de fibroblastos entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

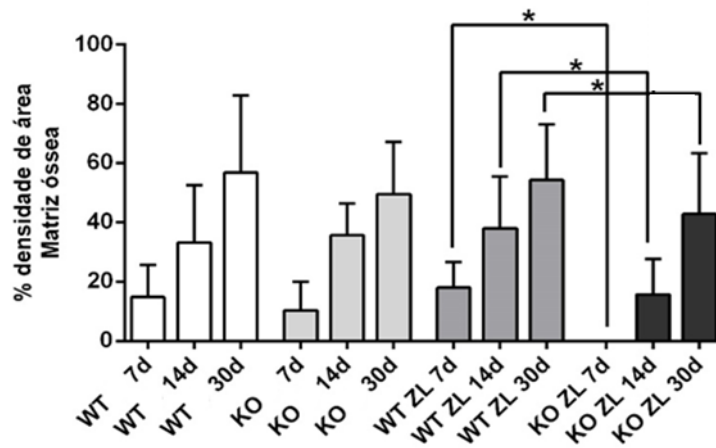
Figura 6 – Mensuração da área de fibras colágenas



Porcentagem da densidade de área de fibras entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

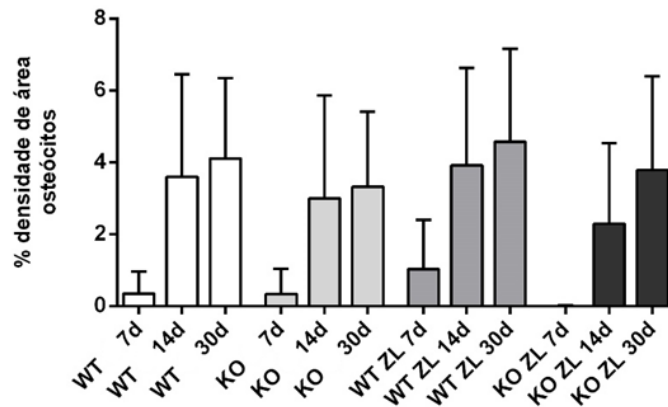
Figura 7 – Mensuração da área da matriz óssea



Porcentagem da densidade de área de matriz óssea entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

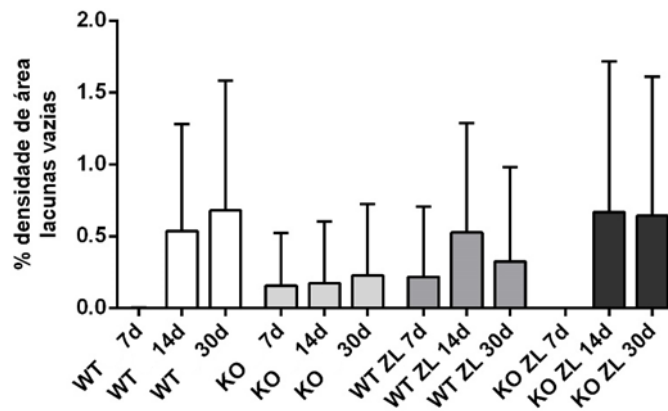
Figura 8 – Mensuração da área de osteócitos



Porcentagem da densidade de área de osteócitos entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

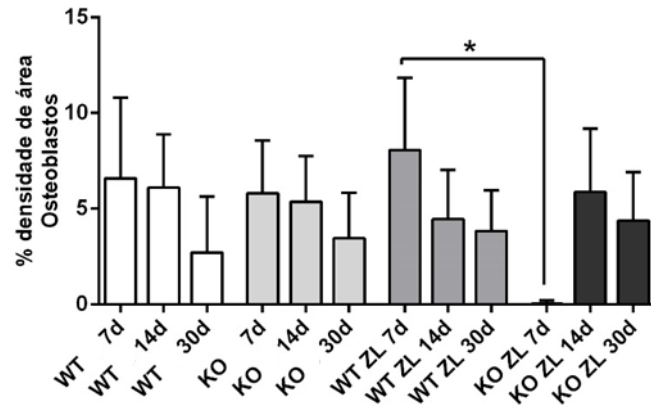
Figura 9 – Mensuração da área de lacunas vazias



Porcentagem de densidade de área de lacunas vazias entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

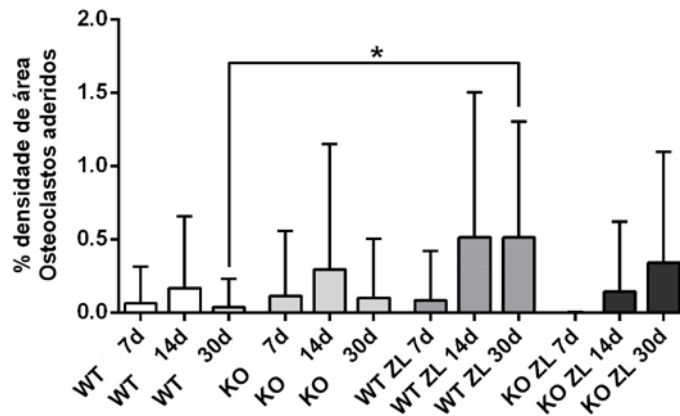
Figura 10 – Mensuração da área de osteoblastos



Porcentagem de densidade de área de osteoblastos entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

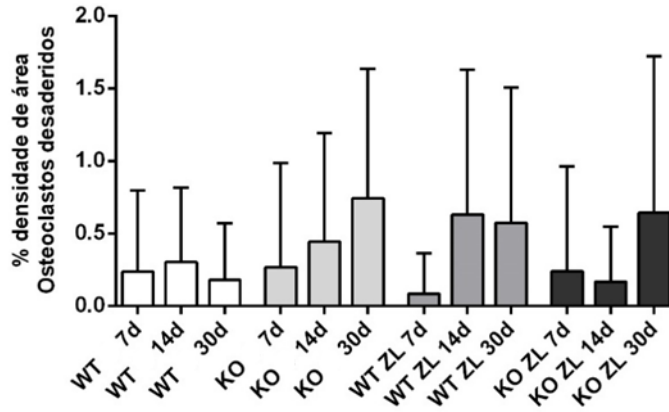
Figura 11 – Mensuração da área de osteoclastos aderidos



Porcentagem de densidade de área de osteoclastos entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04, 2022

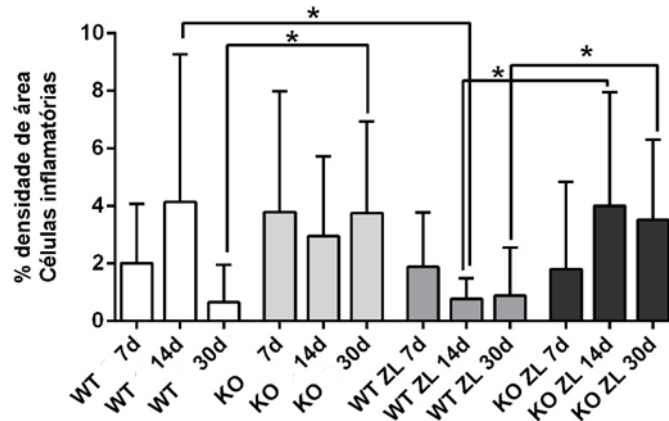
Figura 12 – Mensuração da área de osteoclastos desaderidos



Porcentagem de densidade de área de osteoclastos desaderidos entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

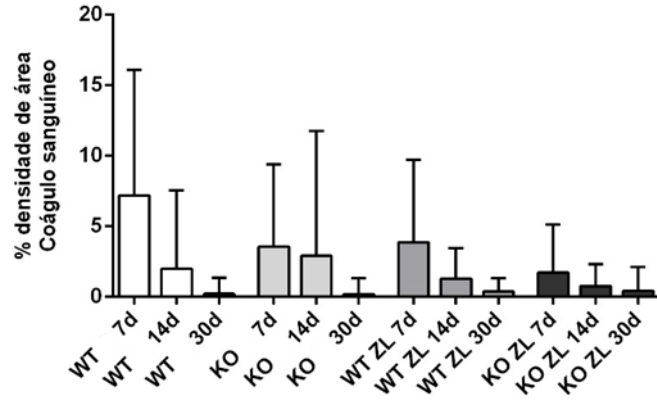
Figura 13 – Mensuração da área de células inflamatórias



Porcentagem de densidade de área de células inflamatórias entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

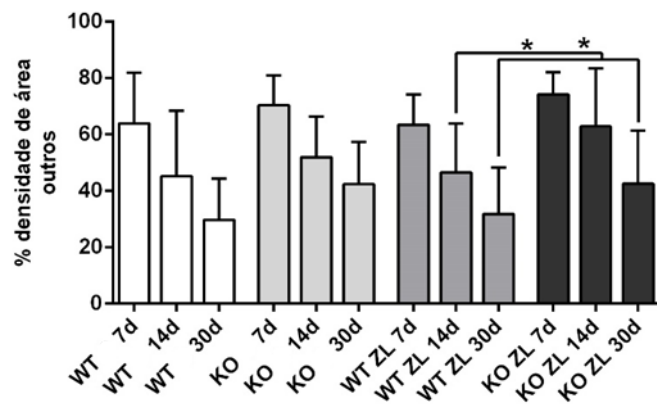
Figura 14 – Mensuração da área de coágulo sanguíneo



Porcentagem de densidade de área de coágulo sanguíneo entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

Figura 15 – Mensuração da área de outros elementos



Porcentagem de densidade de área de outros elementos entre os grupos e seus períodos. O (*) revela as diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

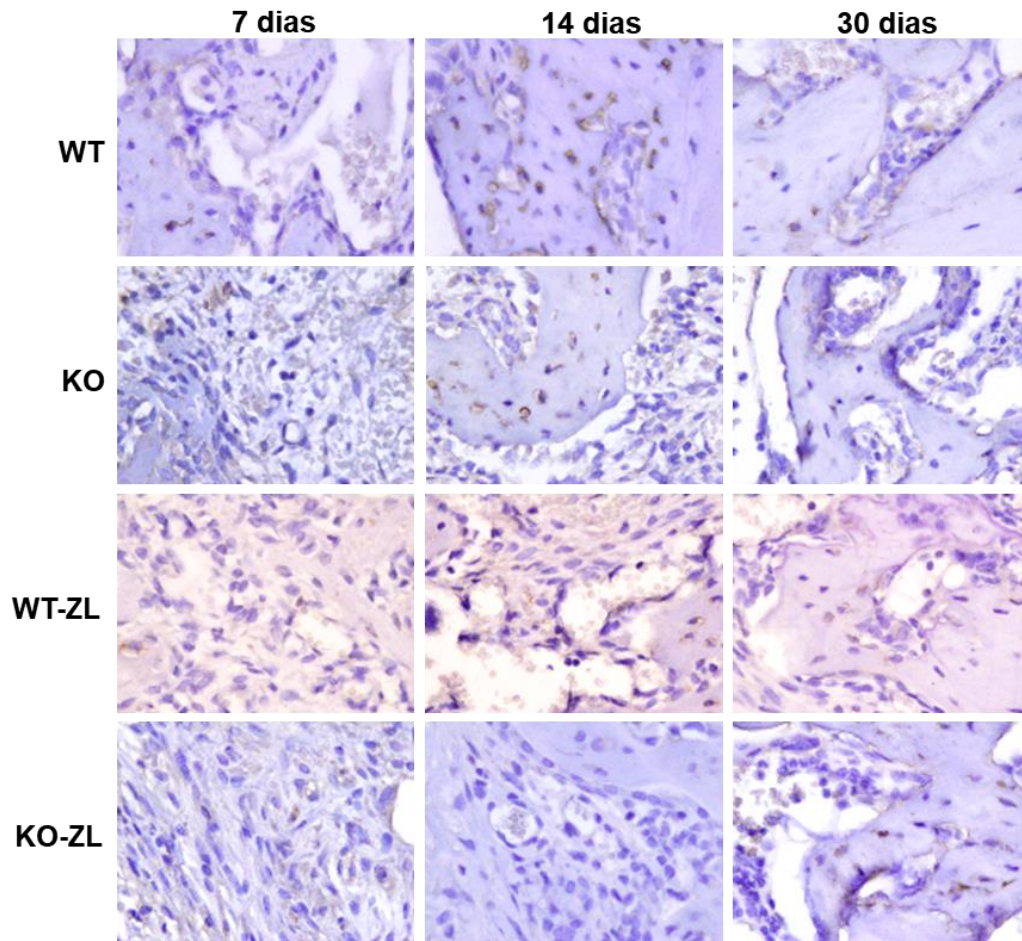
3.2 Imuno-histoquímica

3.2.1 Análise semiquantitativa

Após a imunomarcção, identificação e análise semiquantitativa das proteínas COX-2, OPG, RANK-L e TRAP, os escores obtidos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn considerando o nível de significância de 5%. Um gráfico representativo obtido das médias dos scores foi produzido para ilustrar as diferenças significativas dos scores.

COX-2 - Observou-se marcação positiva para a enzima COX-2 nas células do tecido ósseo, como osteócitos e osteoblastos, bem como nas células inflamatórias. O grupo WT apresentou aumento significativo das células imunomarcadas para COX-2 no período de 14 dias quando comparado com todos os outros grupos e períodos. Na comparação entre os demais períodos e grupos, não se detectou diferença estatisticamente significativa (Figuras 16 e 17).

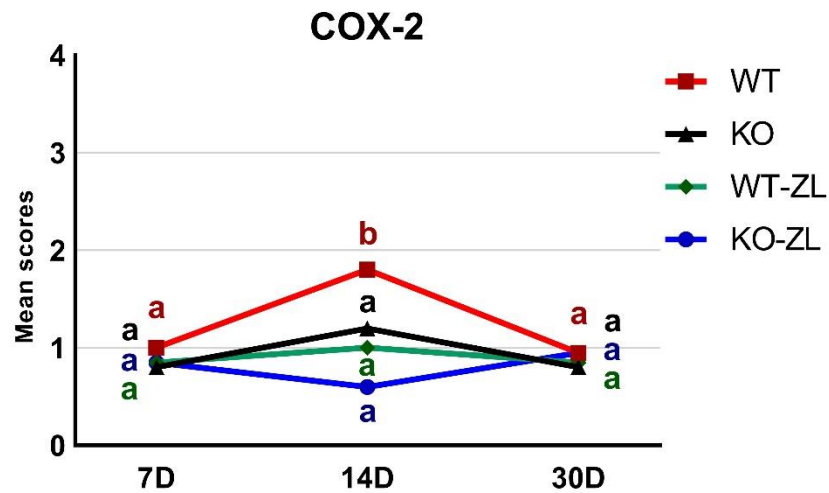
Figura 16 - Imagens imuno-histoquímicas representativas para COX-2



Osteócitos e osteoblastos marcados positivamente para COX-2, bem como nos leucócitos (aumento original 100x)

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 17- Média dos scores para COX-2

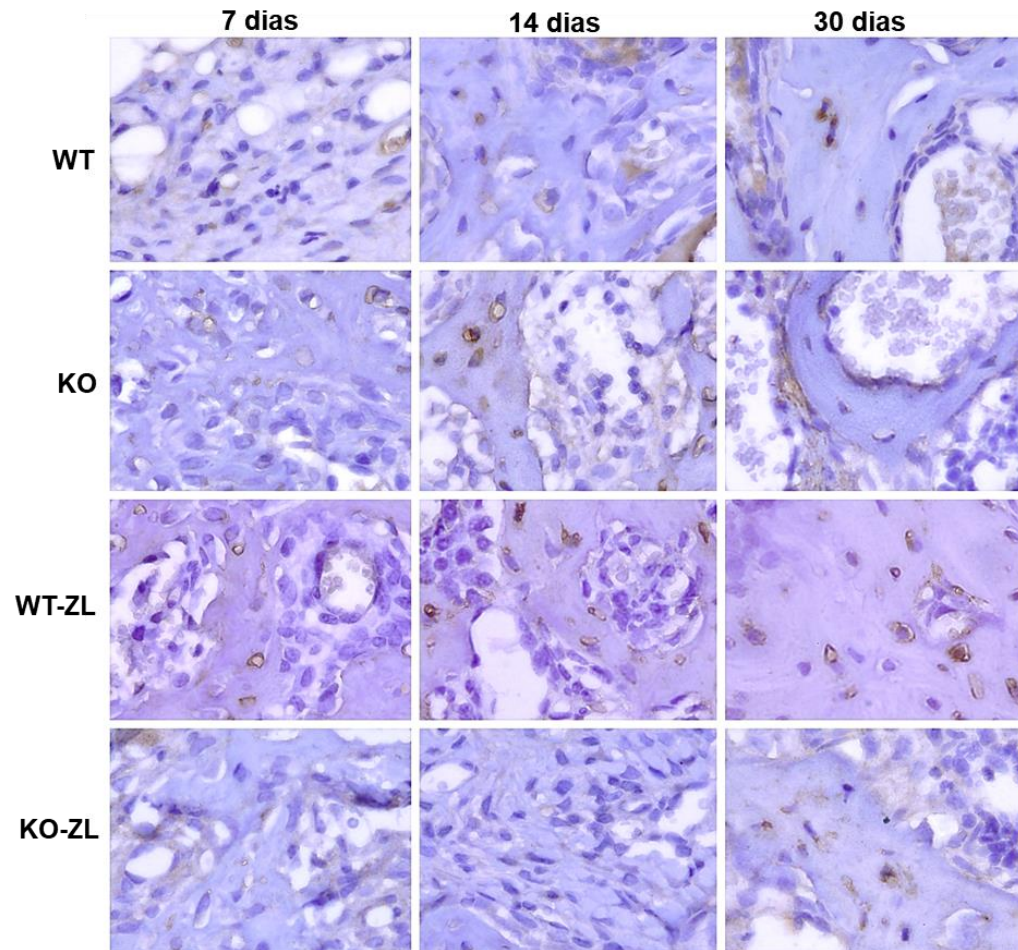


Letras individuais diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação de grupos ou períodos. Associação de letras indica semelhança estatística caso coincida a totalidade das letras de, pelo menos, uma das partes comparadas.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

OPG – Imunomarcção OPG+ foi constatada em todos os períodos de todos os grupos e identificada em osteoblastos, células do tecido conjuntivo e osteócitos, como pode ser observado no esquema representativo da Figura 18. As imunomarcções de OPG no período de 7 dias não apresentaram diferença estatística entre os grupos WT, WT-ZL e KO-ZL, apresentando apenas diferença estatística significativa para o grupo KO. No período de 14 dias, o grupo KO apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos WT e KO-ZL, não apresentando diferença estatística com WT-ZL. No tempo de 30 dias, houve diferença estatística apenas entre os grupos KO e KO-ZL (figura 18). Na comparação intragrupo, é possível observar uma diferença estatística entre períodos de um mesmo grupo, sendo que todos os grupos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na marcação de OPG quando comparado o período de 7 dias com o de 30 dias (Figuras 18 e 19).

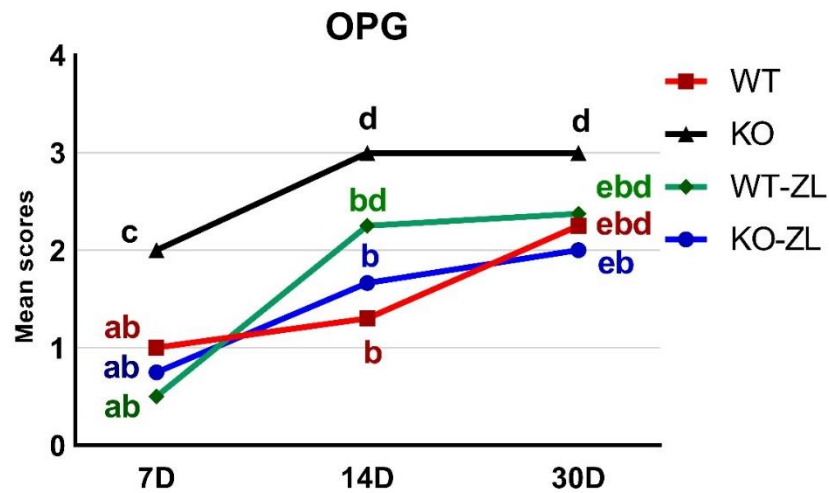
Figura 18 - Imagens imuno-histoquímicas representativas para OPG



Osteócitos, osteoblastos e células do tecido conjuntivo apresentaram marcação positiva para a proteína OPG (aumento original 100x).

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 19- Média dos scores para OPG

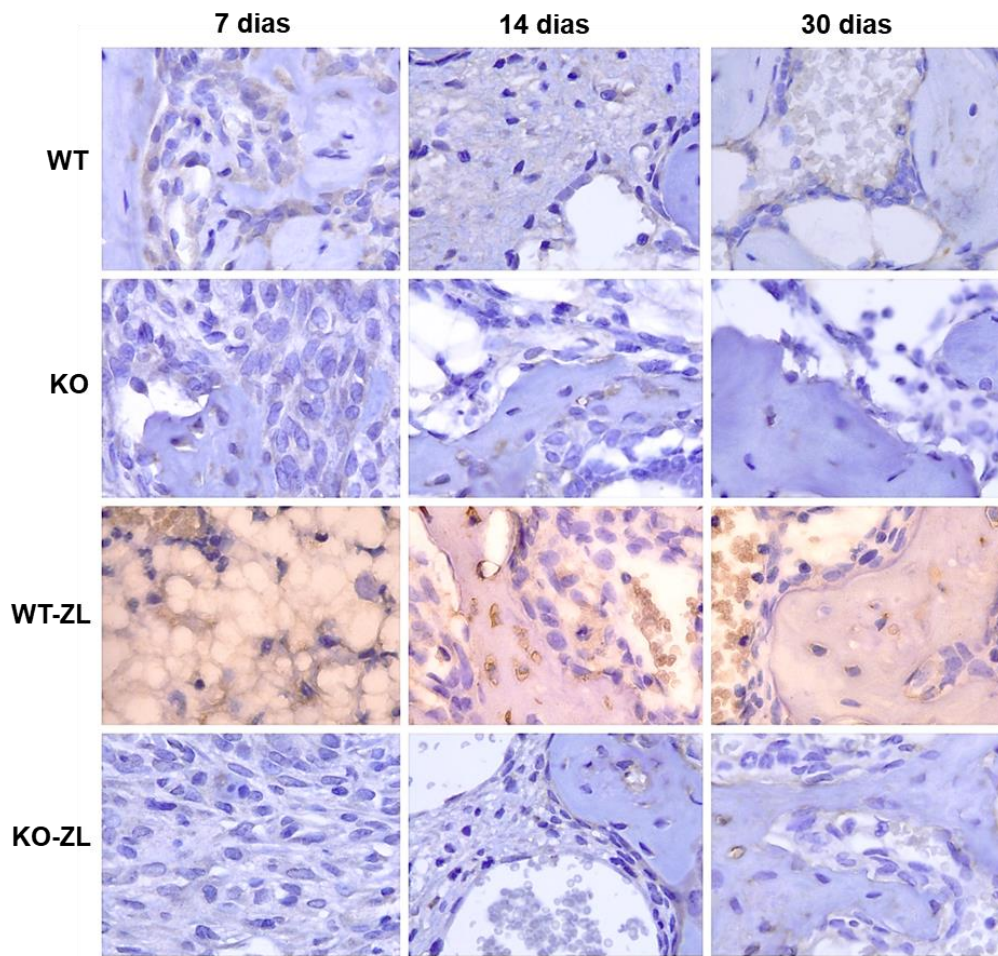


Letras individuais diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação de grupos ou períodos. Associação de letras indica semelhança estatística caso coincida a totalidade das letras de, pelo menos, uma das partes comparadas.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

RANKL - Células RANKL+ também foram identificadas em todos os períodos dos quatro grupos. A imunomarcagem positiva no período de 7 dias se deu principalmente em tecido conjuntivo e osteoblastos próximos ao osteóide, não obstante, nos períodos de 14 e 30 dias, a imunomarcagem predominava em osteoblastos próximos à superfície óssea e osteócitos. A marcação de RANKL dos grupos KO e KO-ZL se manteve sem variação significativa em todos os períodos de eutanásia, tanto na comparação intergrupo quanto intragrupo. Aos 7 dias houve diferença estatística apenas entre o grupo WT e KO-ZL. No período de 14 dias somente WT-ZL e KO-ZL apresentaram diferença estatística significativa. Os grupos WT, KO e KO-ZL, quando comparados, não apresentaram diferença estatística nos períodos de 14 e 30 dias. Aos 30 dias, WT-ZL apresentou-se com marcação significativamente maior quando comparado com WT e KO-ZL ($p < 0,05$) (Figuras 20 e 21).

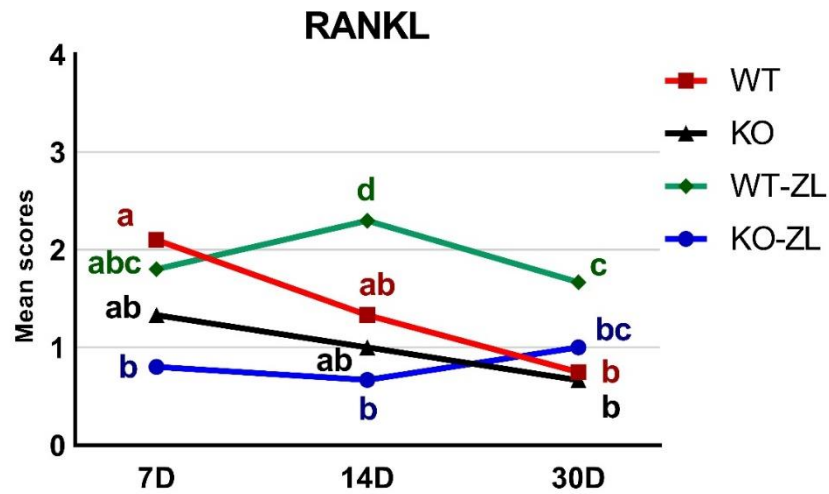
Figura 20 - Imagens imuno-histoquímicas representativas para RANKL



A marcação de RANKL de todos os grupos se manteve entre fraca e moderada, evidenciando principalmente osteoblastos e osteócitos (aumento original 100x)

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

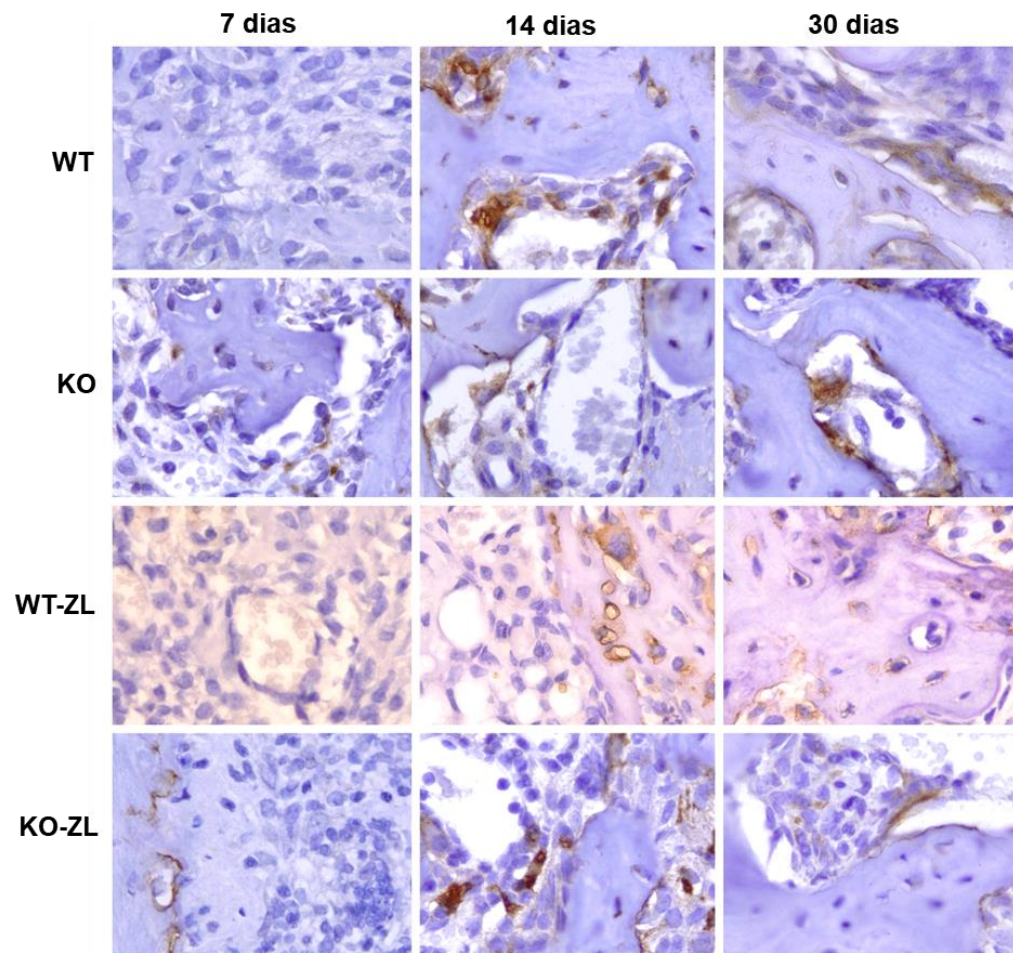
Figura 21- Média dos scores para RANKL



Letras individuais diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação de grupos ou períodos. Associação de letras indica semelhança estatística caso coincida a totalidade das letras de, pelo menos, uma das partes comparadas.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

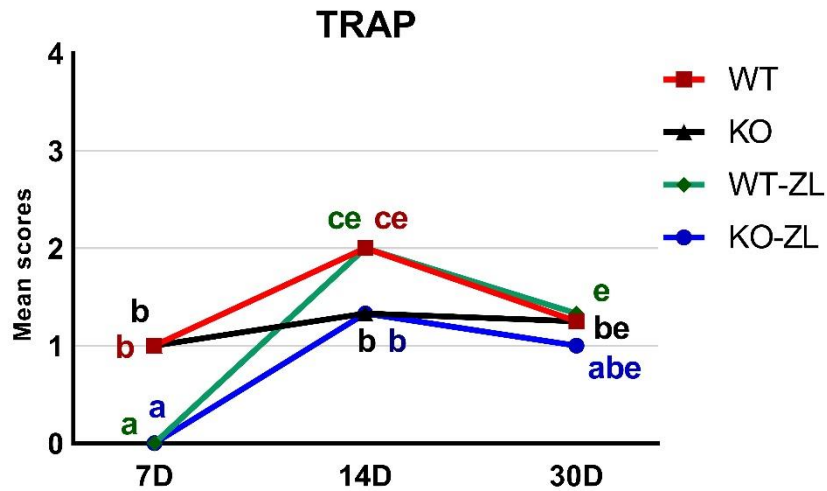
TRAP – Não detectou-se imunomarcção TRAP+ no período de 7 dias, nos grupos WT-ZL e KO-ZL. Conseqüentemente, quando comparados aos respectivos grupos controle (WT e KO) apresentaram diferença estatística, apesar da fraca marcação para TRAP neste período. Aos 14 e 30 dias não houve diferença estatística intragrupos, porém, no período de 14 dias, WT e WT-ZL apresentaram score semelhante e diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparados com KO e KO-ZL (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Imagens imuno-histoquímicas representativas para TRAP

A marcação de TRAP de todos os grupos se manteve principalmente fraca em 7 dias, com significativo aumento de sua expressão em 14 dias (aumento original 100x).

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 23 - Média dos scores para TRAP



Letras individuais diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação de grupos ou períodos. Associação de letras indica semelhança estatística caso coincida a totalidade das letras de, pelo menos, uma das partes comparadas.

Fonte: GraphPad Prism® 7.04 (2022).

4 DISCUSSÃO

Sabe-se que a terapêutica com nBF é comumente realizada por pacientes portadores de doenças de caráter osteolítico a fim de se minimizar a reabsorção do tecido ósseo [18] de modo que a inibição das funções osteoclásticas pelos nBF consiste em alterações morfológicas que envolvem tanto mudanças no citoesqueleto quanto na borda pregueada, membrana típica de osteoclastos em atividade [19], tornando-o, assim, inativo para reabsorção óssea.

No presente estudo, foram utilizados camundongos da linhagem 129Sv como modelos experimentais visto sua proximidade fisiológica com o organismo humano [20], para facilitar e trazer para mais próximo os eventos gerais, sendo, como enfoque do trabalho, o metabolismo ósseo. Apesar disso, a maioria dos trabalhos que investiga o papel da 5-LO no reparo ósseo utiliza osso endocondral como modelo [15] diferindo do modelo utilizado neste trabalho, que analisa a reparação de osso intramembranoso.

A dose de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ parece ter sido insuficiente para alterar de maneira importante o processo de reparo alveolar, não tendo sido detectadas diferenças significativas nos parâmetros: vasos sanguíneos, lacunas vazias, osteócitos,

osteoclastos não aderidos e coágulos, o que nos faz questionar a instalação da OM neste modelo.

Apesar disso, parâmetros importantes como o infiltrado inflamatório e matriz óssea neoformada, revelaram que os animais com inibição da enzima 5-LO (KO) sofreram uma influência mais significativa do nBF, refletindo um atraso no reparo ósseo na comparação dos três períodos. Se somente os valores numéricos fossem considerados, poderíamos concluir que não houve instalação da OM. No entanto, o aspecto histopatológico revelou morfologias importantes que devem ser consideradas.

Na análise do grupo WT, notou-se claramente que o curso biológico do reparo ocorreu dentro dos padrões de normalidade [24]. Na presença de nBF (WT-ZL), apesar de a matriz óssea já ser visualizada aos 7 dias, a mesma se encontrava irregular com contornos difusos, com infiltrado inflamatório evidente, o qual persistiu até os 30 dias.

O grupo KO, mostrou reparo alveolar acelerado no primeiro período, confirmando informações já descritas previamente [14]. Quando da associação com nBF (KO-ZL), ficou evidente um atraso no processo de reparo alveolar, com atividade osteogênica perdurando até os 14 dias. Assim sendo, o grupo que aparentemente foi mais afetado pela dose do medicamento, especialmente quando comparado com o WT-ZL, foi o KO-ZL. Chamou a atenção neste grupo (KO-ZL) suas características histopatológicas. No período de 14 dias, as trabéculas ósseas primárias exibiam osteócitos com núcleos ora grandes e evidentes, ora picnóticos em grandes lacunas. Eventualmente, a matriz óssea mostrava-se irregular, semelhante a "algodão", até o período de 30 dias.

O infiltrado inflamatório foi contabilizado considerando leucócitos PMNs e MNs, sem distinção. No entanto, ficou evidente a predominância de MNs, especialmente no grupo com nBF. Sabe-se que os PMNs neutrófilos exercem papel relevante na imunidade inata, especialmente na cavidade bucal, pela sua capacidade de reconhecimento, alto poder de fagocitose e morte de uma série de microorganismos, especialmente bactérias [21]. Deste modo, a influência dos nBFs sobre a função destes leucócitos também é alvo de investigação. Favot *et al.* [22], demonstraram por meio de estudo clínico de pacientes portadores de BRONJ, os

efeitos inibitórios prolongados destes medicamentos na população neutrofílica, em indivíduos que já haviam interrompido o tratamento com vBFs tanto administrados por via oral ou endovenosa, por cerca de 1,5 anos. Somado a isto, constatou-se que a inibição da 5-LO também leva a uma inibição da ativação de neutrófilos, porém, em contexto de doença inflamatória aguda como a pancreatite [23]. Deste modo, pode-se sugerir que os efeitos do ZL nos animais 5-LOKO podem potencializar a instalação da OM interferindo na primeira linha de defesa do organismo.

A imunomarcagem da enzima COX-2, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos, com exceção do grupo WT na comparação entre o período de 14 e 30 dias, com diminuição de COX-2 aos 30 dias. Considerando-se o papel da COX-2 na osteoblastogênese, tais resultados mostraram-se coerentes. No entanto, poderia se esperar que a ausência da 5-LO resultasse em um aumento na expressão de COX-2, o que não foi possível observar neste estudo.

O peptídeo sinalizador RANKL é responsável pela diferenciação e maturação osteoclásticas e possui a proteína OPG como competidora antagonista para regular negativamente este estímulo produtivo [24]. Quando é comparada a quantificação de área de osteoclastos aderidos com a imunomarcagem de RANKL, é observado que os grupos e períodos de maior expressão de RANKL, apresentam também maior número de osteoclastos, seguindo a mesma tendência numérica em todos os grupos, com diferença estatística entre os grupos WT e WT-ZL aos 30 dias, evidenciando maior densidade de área de osteoclastos aderidos para o grupo WT-ZL neste período. A expressão de RANKL em pacientes em uso crônico de nBF parece ser suprimida em alguns estudos [25, 26], porém também já foi demonstrado em humanos que tanto a expressão de RANKL/OPG quanto a expressão de indicadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , podem não apresentar diferença significativa entre pacientes que fazem ou não o uso crônico de bifosfonatos [27, 28].

Apesar das diferenças, as médias dos grupos apresentaram uma tendência horizontal, porém numericamente decrescente, para a expressão de RANKL na comparação intragrupo e crescente para OPG. Esta tendência é esperada quando se observa o papel da expressão dessas proteínas nas fases do reparo alveolar ósseo, de forma que o reparo se inicia com um processo inflamatório que passa pela reabsorção do coágulo presente, proliferação celular com deposição de fibras colágenas, maturação do tecido conjuntivo e síntese, maturação e mineralização de

osteóide [29]. A expressão de OPG foi maior aos 30 dias em todos os grupos, o que demonstra proximidade com o reparo alveolar ósseo fisiológico, de forma que o aumento de expressão de OPG acompanha o aumento da área de matriz óssea. A expressão de RANKL, por outro lado, apresenta uma expressão menor que OPG, pois gradativamente a sua ação é inibida por ela, diminuindo a reabsorção óssea e permitindo um débito positivo de formação óssea [30].

A TRAP é uma enzima presente na borda corrugada dos osteoclastos que, por tanto, está associada à atividade osteoclástica [27]. Foi observada expressão de TRAP significativa aos 7 dias quando comparou-se os grupos WT com WT-ZL e KO com KO-ZL, evidenciando que os grupos com tratamento por bifosfonato apresentaram menor expressão de TRAP, como também pode ser encontrado na literatura [28]. Contudo, no modelo do presente trabalho, não refletiu com diferença estatística na densidade de área de osteoclastos aderidos na avaliação histológica, o que reforça a importância de diferentes métodos de análise para entender o papel dessas proteínas em um modelo animal com poucos estudos acerca da dinâmica dos ossos endocondrais. Ao avaliar individualmente os períodos de cada grupo, a expressão de TRAP aumentou significativamente ($p < 0,05$) em quase todos os grupos quando comparados os períodos de 7 e 14 dias, com exceção do grupo KO, que se manteve no mesmo nível. Todos os grupos apresentaram um pico de valor numérico de expressão de TRAP aos 14 dias, o que corresponde com achados anteriores que apontam esse período com alta taxa de remodelação óssea e expressão desta proteína [31].

Os resultados demonstram que a OM (clínica e subclínica), não se desenvolve facilmente neste modelo animal, mesmo apresentando fenótipo osteopetrótico, apesar de o nBF ter prejudicado significativamente seu reparo.

A dose aplicada de ZL (500 µg/Kg) não exerceu influência no reparo do grupo WT-ZL quando comparado com o grupo WT. Visto a vasta literatura a respeito da influência nociva dos nBF para o reparo ósseo, pode ser inferido que consistiu em uma dosagem baixa para este modelo animal. O grupo KO se mostrou mais sensível aos efeitos deletérios do ZL ao reparo ósseo. A ausência da enzima 5-LO deste modelo animal associada à farmacoterapia com ZL resultou em um atraso significativo no reparo ósseo quando comparado WT-ZL em todos os períodos, sendo que além de menor produção de matriz óssea pelo grupo KO-ZL, foi

observado maior número de células inflamatórias, principalmente nos períodos de 14 e 30 dias.

Estudos adicionais sobre o papel da 5-LO associada ao nBF de alta potência na instalação das OMs devem ser incentivados, a fim de se contribuir para o entendimento dos eicosanóides em sua etiopatogenia.

5 CONCLUSÃO

Os animais 5-LOKO apresentaram quantidade semelhante de formação de matriz óssea em alvéolos dentários pós-exodontia comparados com os animais WT. No entanto, a ausência da enzima 5-lipoxigenase, nos camundongos 5-LOKO, mostrou papel decisivo para o atraso no reparo ósseo alveolar causado pelo tratamento com ZL neste modelo animal.

REFERÊNCIAS

1. Rogers, M.J., et al., *Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Bone, 2011. **49**(1): p. 34-41.
2. Gutta, R. and P.J. Louis, *Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **104**(2): p. 186-93.
3. Bonewald, L.F., *The amazing osteocyte*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(2): p. 229-38.
4. Loisel, A.E., J.X. Jiang, and H.J. Donahue, *Gap junction and hemichannel functions in osteocytes*. Bone, 2013. **54**(2): p. 205-12.
5. Mori, S., et al., *Trabecular bone volume and microdamage accumulation in the femoral heads of women with and without femoral neck fractures*. Bone, 1997. **21**(6): p. 521-6.
6. Everts, V., T.J. de Vries, and M.H. Helfrich, *Osteoclast heterogeneity: lessons from osteopetrosis and inflammatory conditions*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(8): p. 757-65.
7. Vermeer, J.A., et al., *Jaw bone marrow-derived osteoclast precursors internalize more bisphosphonate than long-bone marrow precursors*. Bone, 2013. **57**(1): p. 242-51.
8. Hoefert, S., et al., *Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases*. Clin Oral Investig, 2015. **19**(2): p. 497-508.
9. Simon, A.M. and J.P. O'Connor, *Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(3): p. 500-11.
10. Lin, H.N. and J.P. O'Connor, *Immunohistochemical localization of key arachidonic acid metabolism enzymes during fracture healing in mice*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88423.
11. Kang, J.H., et al., *5-Lipoxygenase inhibitors suppress RANKL-induced osteoclast formation via NFATc1 expression*. Bioorg Med Chem, 2015. **23**(21): p. 7069-78.
12. Martel-Pelletier, J., et al., *Regulation of the expression of 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase and the synthesis of leukotriene B(4) in osteoarthritic chondrocytes: role of transforming growth factor beta and eicosanoids*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(12): p. 3925-33.
13. Garcia, C., et al., *Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo*. 1996. **11**(11): p. 1619-1627.
14. Bonewald, L.F., et al., *Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness, in Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*. 1997, Springer. p. 299-302.
15. Manigrasso, M.B. and J.P. O'Connor, *Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene*. Acta Orthop, 2010. **81**(6): p. 748-55.
16. Pazianas, M., *Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(3): p. 232-40.
17. Pedrosa Jr, W.F., et al., *Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone*. 2009. **20**(11): p. 1254-1264.
18. Conwell, L.S. and A.B. Chang, *Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2012(4): p. CD002010.
19. Rodan, G.A. and H.A. Fleisch, *Bisphosphonates: mechanisms of action*. J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2692-6.
20. Dutta, S. and P.J.L.s. Sengupta, *Men and mice: relating their ages*. 2016. **152**: p. 244-248.
21. Amin, D., et al., *Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis*. 1992. **33**(11): p. 1657-1663.
22. Favot, C.L., C. Forster, and M. Glogauer, *The effect of bisphosphonate therapy on neutrophil function: a potential biomarker*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2013. **42**(5): p. 619-26.
23. Liao, D., et al., *Inhibition of 5-lipoxygenase represses neutrophils activation and activates apoptosis in pancreatic tissues during acute necrotizing pancreatitis*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **498**(1): p. 79-85.

24. Belibasakis, G.N. and N. Bostanci, *The RANKL-OPG system in clinical periodontology*. J Clin Periodontol, 2012. **39**(3): p. 239-48.
25. Huang, X.-L., et al., *Zoledronic acid inhibits osteoclastogenesis and bone resorptive function by suppressing RANKL-mediated NF- κ B and JNK and their downstream signalling pathways*. 2022. **25**(2): p. 1-12.
26. Ruggiero, S.L., et al., *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2022 Update*. 2022.
27. Pedrosa, W.F., Jr., et al., *Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(11): p. 1254-64.
28. Zojer, N., et al., *Bisphosphonate treatment does not affect serum levels of osteoprotegerin and RANKL in hypercalcemic cancer patients*. 2005. **25**(5): p. 3607-3612.
29. Okamoto, T. and M.J.R.d.F.d.O.d.A. de Russo, *Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats*. 1973. **2**(2): p. 153-169.
30. Kostenuik, P.J. and V. Shalhoub, *Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption*. Curr Pharm Des, 2001. **7**(8): p. 613-35.
31. Hassumi, J.S., et al., *Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis*. J Appl Oral Sci, 2018. **26**: p. e20170326.

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de Ética



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Processo de reparo ósseo intramembranoso e endocondral frente à administração de bifosfonato endovenoso: avaliação comparativa em camundongos 129/Sv-WT e 129/Sv 5-LOKO", protocolada sob o CEUA nº 9589271017, sob a responsabilidade de **Mariza Akemi Matsumoto** e equipe; *Dulce Helena Jardim Constantino* - 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 23/11/2017.

We certify that the proposal "Intramembranous and endochondral healing repair of mice under administration of intravenous bisphosphonate: comparative investigation between 129/Sv-WT and 129/Sv 5-LOKO", utilizing 89 Knockout mice (89 males), protocol number CEUA 9589271017, under the responsibility of **Mariza Akemi Matsumoto** and team; *Dulce Helena Jardim Constantino* - 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 11/23/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **11/2017** a **06/2018** Área: **Odontologia**

Origem: **Biotério Central**
Espécie: **Camundongos Knockout** sexo: **Machos** idade: **6 a 8 semanas** N: **89**
Linhagem: **129/Sv** Peso: **20 a 40 g**

Resumo: A instalação das osteonecroses dos maxilares tem sido relacionada ao uso crônico de medicamentos antirreabsorptivos indicados para doenças e distúrbios do metabolismo ósseo, como os bifosfonatos não-nitrogenados, especialmente quando associados a intervenções cirúrgicas-odontológicas. Apesar do conhecimento estabelecido acerca de sua influência direta sobre as células ósseas, atualmente investiga-se a sua ação sobre as células do sistema imunológico pela capacidade de internalização deste tipo de droga por células do sistema mononuclear fagocitário. Deste modo, especula-se que a instalação desta doença não ocorre somente devido à condição do tecido ósseo e sua capacidade reacional, mas principalmente pela sua condição de defesa imunológica. O presente estudo tem como objetivo analisar o padrão de reparo ósseo de alvéolos dentários de incisivos superiores recém-extraídos de camundongos 129/Sv 5-LOKO, os quais apresentam fenótipo esquelético osteopetrótico, comparando-os com tipo selvagem, 129/Sv WT, com e sem administração de nBP endovenoso, bem como o reparo de defeitos realizados no osso fêmur nestes mesmos animais. Para tanto serão utilizados 89 camundongos machos, com idades variando entre 6 e 8 meses, 40 129/Sv WT e 40 129/Sv 5-LOKO, os quais serão submetidos à exodontia do dente incisivo superior direito e realização de defeito de 1mm de diâmetro em metafase medial do fêmur direito, divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento: Grupo WT □ 0,1 ml de soro fisiológico 0,9% IP, Grupo WT-ZL - 0,5 mg/Kg-1 IP 1x por semana, Grupo 5-LOko - 0,1 ml de soro fisiológico 0,9% IP, Grupo 5-LOko-ZL - 0,5 mg/Kg-1 IP 1x por semana. Após os períodos de 3, 7, 14 e 30 dias cinco animais de cada grupo serão submetidos à eutanásia para remoção das maxilas direitas contendo os alvéolos e os fêmures direitos contendo os defeitos ósseos. Os mesmos serão imediatamente fixados a fim de serem preparados para os procedimentos metodológicos a seguir: escaneamento em microtomógrafo computadorizado, processamento histotécnico para confecção de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina, tricrômico de Goldner, Picrossirius-red, e marcações imunohistoquímicas. Durante o experimento, três animais de cada grupo receberão uma injeção do fluorocromo calceína por via intramuscular no 14o dia pós-operatório e após o 24o dia receberão o fluorocromo alizarina, ambos na dose de 20mg/Kg, e eutanasiados no período de 30 dias para análise da dinâmica da remodelação óssea por meio de microscopia confocal. Após a obtenção dos dados numéricos das análises realizadas, os mesmos serão submetidos à tratamento estatístico, considerando o nível de significância de 5% (p<0,05).

Local do experimento: Biotério da Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 23 de novembro de 2017