



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

Danilo Chizzolini Masocatto

**Efeitos da inibição do receptor 1 de cisteinil leucotrieno e
da enzima 5-LO sobre o processo de osseointegração**

Araçatuba - SP
2022



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

Danilo Chizzolini Masocatto

**Efeitos da inibição do receptor 1 de cisteinil leucotrieno e
da enzima 5-LO sobre o processo de osseointegração**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia

Orientadora: Prof. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientadora: Prof. Assoc. Claudia Cristina Bigueti

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

M398e Masocatto, Danilo Chizzolini.
Efeitos da inibição do receptor 1 de cisteinil leucotrieno e da enzima 5-LO sobre o processo de osseointegração / Danilo Chizzolini Masocatto. – Araçatuba, 2022
53 f. : il. ; tab.

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

1. Camundongos 2. Leucotrienos 3. Osseointegração
I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

A minha família e a minha esposa,
com amor, gratidão e admiração
pois sem eles eu não teria
caminhado tão longe.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Deus...

PAI todo poderoso, muito obrigado pelas dificuldades que enfrentei até aqui, uma vez que, através delas pude reunir forças e fazer este lindo desfecho. Quando estava em dor e sofrimento, bastava um minuto de silêncio em oração que o Senhor acalantava e alegrava nossos caminhos. Que o Mestre possa continuar ao nosso lado sempre que possível, iluminando e aparando nossos corações.

Aos meus amados pais...

Otávio Cézar Masocatto e Marisa Chizzolini Masocatto antes de tudo quero falar que eu os amo muito. Sempre serei muito grato por tudo que fizeram por nossa família, pelas abdições e horas extras para pagar o colégio. E hoje finalizo um ciclo muito importante na minha carreira e entrego a vocês este título do primeiro Doutor com tese defendida da família.

Ao meu irmão Murilo Chizzolini Masocatto, sua esposa Tamiris Barbosa e seus lindos filhos Benício e Vicente...

Obrigado por toda consideração e respeito que temos uns pelos outros. Que nossa família continue sempre unida e na busca da evolução moral e espiritual.

Aos meus avós paternos e maternos...

Obrigado por todo esforço, determinação e amor conosco. Sem eles nossa família não teria essa união tão forte.

À Prof^a Mariza Akemi Matsumoto, minha orientadora e querida por todos nós...

Minha profunda admiração, uma mistura de simpatia e inteligência. Com a senhora aprendi o valor do estudo, me ensinou que estudar é prazeroso, é sempre instigante. Eu cresci muito fazendo parte da equipe da senhora, cheguei onde eu nunca pensei em chegar. Professora muito obrigada pelas oportunidades, por cada ensinamento e crescimento científico, quero que saiba que és um espelho para mim.

À Prof^a Cláudia Cristina Biguetti, minha coorientadora...

Ser humano ímpar, muito inteligente, de extrema humildade e altruísmo de sobra. Agradeço por toda ajuda e mentoria durante esses anos. Que Deus continue te iluminando com este dom maravilhoso que você tem de ensinar.

À minha Banca Examinadora...

Formada por professores muito queridos e cativantes, que transmitem o ensinamento de forma leve, fluída e com muita alegria. Professores Francisley

Ávila Souza, Celso Koogi Sonoda e André Fabris, fico muito feliz por ter vocês como minha banca examinadora, agradeço imensamente pelo aceite do convite. Ao Professor José Carlos Garcia de Mendonça ao qual fez parte do meu processo de formação na Cirurgia Buco-maxilo-facial e hoje também faz parte deste importante desfecho de defesa de tese. E a Professora Ellen Cristina Gaetti Jardim, tutora e amiga que me incentivou a seguir na área científica, meus sinceros agradecimentos por fazer parte desta banca de Doutorado.

À minha esposa, Jaqueline Suemi Hassumi...

Essa japonesa linda, amorosa, atenciosa e muito dedicada a família. Graças a você tudo ficou ainda melhor desde que te conheci, os meus domingos ficaram alegres. Só tenho a agradecer por ter te conhecido naquele jogo da copa do mundo em 2010 na moradia estudantil da Unesp... E devo muito a você por estar hoje defendendo esta tese de Doutorado. Meus sinceros agradecimentos tesouro da minha vida! Te amo muito! **Agradeço ao meu sogro Mitsuyuki e a minha sogra Suely Hassumi** por todo amparo, acolhimento e

respeito. Sou muito grato em fazer parte dessa família maravilhosa.

Ao Exército Brasileiro e a Seção de Saúde do 9º GAC/Nioaque...

Esta linda Instituição, onde recebi meu primeiro “soldo”, e tenho enorme prazer em servi-la, onde fui capaz de concluir o mestrado e o doutorado. Agradeço aos meus comandantes: Coronel Couto, Cabral, Peter, De Paula e ao Subcomandante Major Ruhena pela oportunidade que me deram de seguir em frente e terminar os estudos. Muito obrigado a todos os meus colaboradores da Seção de Saúde, local onde passo boa parte do meu dia e me sinto honrado em trabalhar com todos vocês.

Aos meus amigos do grupo “camundongos”...

Todos vocês fizeram “nascer” esta tese de doutorado. Cada um ajudou de maneira criteriosa para que este maravilhoso dia chegasse. Aos amigos André, Raquel, Kim, Juliana, Gustavinho, Carol Bacelar, Carol Becher, Vinícius, Ana Júlia, Nataira e Ramez obrigado por me ajudarem tanto!

Aos que contribuem para o funcionamento da FOA...

Mesmo em meio a pandemia, vocês foram essenciais para o funcionamento da faculdade. Muito obrigada pela dedicação de vocês.

Universidade, Diretor e Vice...

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

À coordenação do programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” na pessoa do Prof. Assoc. Wirley Gonçalves Assunção.

Epígrafe

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

MASOCATTO, D.C. **Efeitos da inibição do receptor 1 de cisteinil leucotrieno e da enzima 5-LO sobre o processo de osseointegração.** 2022. 53 f. Tese (Dourado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da inibição do receptor 1 de cisteinil leucotrieno (CisLT1R) e da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) sobre o processo de reparo peri-implantar oral em camundongos. Para tanto, um total de 63 camundongos machos da linhagem 129/Sv foram utilizados, com idades variando de 12 a 14 semanas, sendo 42 animais WT (do inglês *Wild Type*) e 21 animais geneticamente modificados (*knockout-KO*) para a enzima 5-LO (5-LOKO), a fim de comporem os seguintes grupos: Controle/WT, MTK/WT e 5-LOKO. Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para instalação de um micro parafuso de titânio (liga Ti-6Al-4V) na região edêntula da maxila, imediatamente à frente do primeiro molar esquerdo. Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais do grupo MTK/WT foram medicados 2 mg/Kg/dia de montelucaste (MTK), via oral, em volume de 10ul, iniciando um dia antes do procedimento e continuando até o final dos períodos experimentais, fixados aos 7, 14 e 30 dias pós-operatórios. Os animais dos grupos Controle/WT e 5-LOKO receberam 10ul de solução fisiológica 0,9%, seguindo o mesmo protocolo dos animais MTK/WT. Completados os períodos, os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta das amostras e subsequente processamento para análises histológicas e imunohistoquímicas para avaliação do processo de reparo peri-implantar. Após a obtenção dos dados quantitativos, os mesmos foram submetidos a tratamento estatístico considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os animais dos grupos MTK/WT e 5-LOKO apresentaram formação precoce de tecido ósseo ao redor dos implantes, maior número de células COX-2+ e menor de células TRAP+, quando comparados com animais do grupo Controle/WT. Concluiu-se que, a inibição do CisLT1R pelo MTK, bem como a ausência do gene para a 5-LO aceleraram o processo de reparação óssea peri-implantar oral no presente modelo experimental.

Palavras-chave: Camundongos. Leucotrienos. Osseointegração.

MASOCATTO, D. C. **Effects of inhibition of cysteinyl leukotriene receptor 1 and 5-LO enzyme on the osseointegration process.** 2022. 53 f. Thesis (PhD) – School of Dentistry of Araçatuba, Paulista State University, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effects of inhibition of cysteinyl leukotriene receptor 1 (CisLT1R) and 5-lipoxygenase enzyme (5-LO) on the process of oral peri-implant repair in mice. For this purpose, a total of 63 male mice of the 129/Sv strain were used, with ages ranging from 12 to 14 weeks, of which 42 WT (Wild Type) and 21 genetically modified (knockout-KO) animals for the 5-LO enzyme (5-LOKO), in order to compose the following groups: Control/WT, MTK/WT and 5-LOKO. All animals were submitted to a surgical procedure to install a titanium micro screw (Ti-6Al-4V alloy) in the edentulous region of the maxilla, immediately in front of the first left molar. Previous to the surgical procedure, the animals in the MTK/WT group were medicated 2 mg/Kg/day of montelukast (MTK), orally, in a 10ul volume, starting one day before the procedure and continuing until the end of the experimental periods, set at 7, 14 and 30 postoperative days. The animals in the Control/WT and 5-LOKO groups received 10ul of 0.9% saline solution, following the same protocol as the MTK/WT animals. After the periods were completed, the animals were euthanized for sample collection and subsequent processing for histological and immunohistochemical analysis to evaluate the peri-implant repair process. After obtaining the quantitative data, they were submitted to statistical treatment considering a significance level of 5% ($p < 0.05$). Animals in the MTK/WT and 5-LOKO groups showed early bone tissue formation around the implants, higher numbers of COX-2+ cells and fewer TRAP+ cells, when compared to animals in the Control/WT group. It was concluded that, the inhibition of CisLT1R by MTK as well as the absence of the gene for 5-LO accelerated the process of oral peri-implant bone repair in the present experimental model.

Keywords: Mice. Leukotrienes. Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais dos grupos Controle/WT e 5-LOKO.	27
FIGURA 2 – Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais do grupo MTK/WT.	27
FIGURA 3 – Dimensões do micro parafuso de titânio.	28
FIGURA 4 – Imagens representativas da cirurgia de instalação do micro parafuso de titânio. (A) Preparo do sítio cirúrgico, (B) perfuração guia com broca de 0,5 mm de diâmetro, (C) instalação do micro parafuso de titânio e (D) micro parafuso de titânio instalado.	30
FIGURA 5 – Imagem ilustrativa para região de análise. (A) Imagem da lâmina de maxila na lente objetiva 2x. (B) Imagem aumentada da região do implante de titânio. Os traços vermelhos correspondem a superfície entre 2ª e 4ª rosca dos implantes, no sentido cérvico-apical (HE; A – aumento original 2x; B – amento original 20x)	33
FIGURA 6 – Grupo Controle/WT 7D – Em contato com a superfície do implante observa-se tecido de granulação (TG) com moderado infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), com macrófagos com grânulos acastanhados (*), coágulo e vaso sanguíneo (seta preta), tecido ósseo não vital associado à atividade osteoclástica (#) e áreas de osteoclastogênese (+). (HE; aumento original de 100x)	34
FIGURA 7 – Grupo Controle/WT 14D – Observa-se neoformação óssea em contato com a superfície do implante e, entre o tecido ósseo maduro (TO) com osteócitos (seta amarela) e o tecido conjuntivo osteogênico (TC) com osteoblastos (seta branca). (HE; aumento original de 100x)	35
FIGURA 8 – Grupo Controle/WT 30D – Observa-se tecido ósseo maduro (TO) em processo de remodelação rico em osteócitos (seta amarela). (HE; aumento original de 100x)	35
FIGURA 9 – Grupo MTK/WT 7D – Observa-se intensa atividade osteoblástica (seta branca), mucosa sinusal com glândulas serosas (&) e fragmentos ósseos não vitais (#). (HE; aumento original de 100x)	36
FIGURA 10 – Grupo MTK/WT 14D – Observa-se predominância de tecido conjuntivo osteogênico na superfície do implante (TC), região de	36

remodelação óssea (seta verde) e tecido ósseo maduro (TO). (HE; aumento original de 100x)

FIGURA 11 – Grupo MTK/WT 30D – Observa-se tecido ósseo maduro (TO) com osteócitos (seta amarela) e discreta atividade de remodelação. (HE; aumento original de 100x) 37

FIGURA 12 – Grupo 5-LOKO 7D – Observa-se formação óssea focal irregular (FOF). (HE; aumento original de 100x) 37

FIGURA 13 – Grupo 5-LOKO 14D - Observa-se tecido ósseo maduro (TO) em remodelação e tecido conjuntivo osteogênico (TC). (HE; aumento original de 100x) 38

FIGURA 14 – Grupo 5-LOKO 30D – Observa-se tecido ósseo maduro (TO) com pouca remodelação e presença de mucosa sinusal (&). (HE; aumento original de 100x) 38

FIGURA 15 – As setas indicam células imunomarcadas para TRAP (aumento original 100x). 40

FIGURA 16 - As setas indicam células imunomarcadas para COX-2 (aumento original 100x). 42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o 26 período de análise.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Resultado da imunomarcção positiva para TRAP entre 39
todos os grupos e períodos. Os asteriscos indicam diferenas
significativas entre os grupos do mesmo período ($p<0,05$).

GRÁFICO 2 – Resultado da imunomarcção positiva para COX-2 entre 41
todos os grupos e períodos. Os asteriscos indicam diferenas
significativas entre os grupos do mesmo período ($p<0,05$)

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO	5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
CisLT	Cisteinil Leucotrieno
CisLT1R	Receptor 1 de Cisteinil Leucotrieno
COX	Ciclooxygenase
FDA	Food and drug administration
IP	Intraperitoneal
KO	Knockout
LT	Leucotrieno
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MTK	Montelukaste
PG	Prostaglandina
RANKL	Ligante ativador do receptor do fator nuclear Kappa B
VO	Via oral
WT	Wild type

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVO	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Delineamento experimental	26
3.2 Animais de experimentação	27
3.3 Material de implantação	28
3.4 Tratamento – inibição farmacológica do CisLT1R	28
3.5 Procedimento cirúrgico para implantação dos dispositivos de titânio	29
3.6 Eutanásia, coleta, preparo e armazenamento de amostras	31
3.7 Processamento histológico e métodos de coloração empregados	31
3.7.1 Análise histológica descritiva	31
3.7.2 Imunoistoquímica	31
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Análise histológica	33
4.1.1 Análise histomorfométrica	33
4.1.1.1 Grupo Controle/WT	33
4.1.1.2 Grupo MTK/WT	35
4.1.1.3 Grupo 5-LOKO	37
4.2 Análise imuno-histoquímica	39
4.2.1 TRAP	39
4.2.2 COX-2	40
5 DISCUSSÃO	43

6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

O esqueleto é uma estrutura altamente dinâmica, que continuamente sofre remodelação para manter a homeostase óssea e de sais minerais do organismo. Dessa forma, os osteoclastos e osteoblastos desempenham um papel coordenado e fundamental na reabsorção e formação óssea respectivamente [1-3]. Uma lesão óssea e até mesmo a instalação de dispositivos de titânio, têm como resposta fisiológica a reação imune/inflamatória local e sistêmica, além de respostas osteogênicas iniciais, com a finalidade de reparação óssea ou osseointegração desses dispositivos [4, 5-8].

Desde a descoberta da osseointegração por Branemark na década de 60, o uso de implantes à base de titânio tem sido utilizado na odontologia para tratamento de edentulismo [9, 10]. Este biomaterial proporciona excelentes resultados a médio e longo prazo, com ancoragem intraóssea e alta capacidade de suportar cargas mecânicas [9–11]. Mesmo com a ampla gama de estudos sobre a osseointegração de biomateriais como o titânio, ainda não é completamente entendida como ocorrem as respostas imunes/inflamatórias favoráveis neste processo [7, 8].

Sabe-se que os fatores pró e anti-inflamatórios no local da injúria, com inflamação moderada, propicia um microambiente próximo do ideal para o reparo e regeneração tecidual [12]. Assim, o conhecimento mais aprofundado das funções pontuais e benéficas de fatores inflamatórios contribuiriam para direcionar a modulação dos processos regenerativos, de forma a favorecer o reparo tecidual e o processo de osseointegração subsequentes, mesmo em condições inflamatórias desfavoráveis por parte do hospedeiro, como em casos de doença do metabolismo ósseo, a osteoporose [13].

Há tempos em que o papel de diferentes fatores inflamatórios na regulação e regeneração óssea vem sendo estudados [12, 14–16]. A maior parte destes trabalhos foca-se no impacto dos imunomoduladores clássicos, como as drogas anti-inflamatórias não esteroides têm sobre o reparo ósseo. Pois, tais medicamentos agem inibindo a ciclooxigenases (COXs) e a produção de prostaglandinas (PGs), além de inibir também as citocinas pró-inflamatórias [12, 17, 18]. Trabalhos focados no papel pontual de diferentes vias inflamatórias e seus

metabólitos sobre o reparo tecidual podem ser mais esclarecedores acerca do papel de tais mediadores sobre o tecido ósseo.

Considerando-se particularmente o papel das COXs e 5-LO sobre o reparo de feridas ósseas ou mesmo remodelação deste tecido em outras situações, estudos por meio de marcação imunohistoquímica ao longo do reparo de fraturas em ossos longos tem demonstrado que ambas são altamente expressas em diferentes fases do reparo [19]. Dessa forma, estudos com camundongos geneticamente modificados, knockouts (KO), têm favorecido o entendimento acerca deste tema [2, 17, 19, 20]. Bonewald et al. [21] e Manigrasso & O'Connor [20]. demonstraram que animais 5-LOKO, submetidos à fratura de fêmur experimental, apresentaram processo de reparo mais acelerado e maior espessamento cortical ósseo quando comparados aos animais controle.

Estudos mostram que a 5-LO atua sobre a osteoclastogênese com o efeito catabólico no tecido ósseo [21, 22]. Por outro lado, as COXs, por meio da produção de prostaglandinas, atuam positivamente sobre osteoblastos favorecendo a neoformação óssea [17, 21–23]. A 5-LO converte o ácido araquidônico (AA) em leucotrienos (LTs), que são mediadores pró-inflamatórios e podem ser divididos em 2 grupos: LTB₄ e cisteinil leucotrieno (CisLT) [24, 25]. Este último, tem sido amplamente estudado, pois desempenha um papel fundamental nas reações pro-inflamatórias em diversas células e tecidos, podendo estar envolvido em várias condições fisiopatológicas, como asma, aterosclerose, doença inflamatória intestinal, tumores, fibrose, doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e defesa imunológica [1, 3].

O MTK é um antagonista de alta afinidade pelo CisLT₁R e, atualmente é utilizado para o tratamento de asma brônquica e rinite alérgica [1, 24]. Vários estudos em animais têm mostrado que o MTK possui ampla gama de atividades anti-inflamatórias, como na prevenção de infartos, em casos de sepse, dano renal e redução da inflamação cerebral pelo envelhecimento [1, 24, 26]. No campo da odontologia, observou-se que seu uso diminuiu o recrutamento de osteoclastos em modelo experimental de movimentação ortodôntica [2]. Além disso, também reduziu a inflamação e a perda óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura [24].

Contudo, as informações sobre os efeitos da 5-LO e seus metabólitos na homeostase e reparo ósseo ainda são escassos, principalmente quando se trata da região maxilofacial.

2 OBJETIVO

O presente estudo visou avaliar os efeitos da inibição do CisLT1R e da enzima 5-LO sobre o processo de reparo peri-implantar oral em camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 63 camundongos machos da linhagem 129/Sv, com idade de aproximadamente 12 a 14 semanas e foram divididos em 3 grupos experimentais com 3 períodos de análise (TABELA 1). Desses 63 animais, 42 eram selvagens (WT) e 21 eram geneticamente deficientes e homozigotos para a enzima 5-LO (5-LOKO).

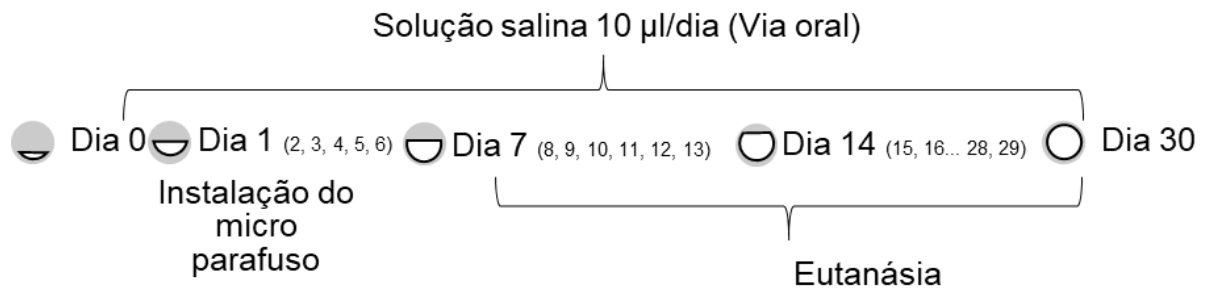
No dia 0, os animais do grupo MTK/WT receberam 2mg/kg/dia do medicamento MTK até os períodos de eutanásia, em volume de 10 uL e administrados via oral (VO). Os animais dos grupos Controle/WT e 5-LOKO receberam 10 uL de solução fisiológica 0,9% estéril, administrada VO, seguindo o mesmo protocolo do MTK. O tratamento de todos os grupos foi realizado a cada 24 horas durante todo o período experimental. No dia 1, todos os animais de todos os grupos, foram submetidos a cirurgia de instalação do micro parafuso de titânio e submetidos à eutanásia após 7, 14 e 30 dias. A linha do tempo do experimento pode ser visualizada nas FIGURAS 1 e 2.

TABELA 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o período de análise

GRUPO PERÍODO	CONTROLE/WT	MTK/WT	5-LOKO	TOTAL
7 DIAS	7	7	7	21
14 DIAS	7	7	7	21
30 DIAS	7	7	7	21
TOTAL	21	21	21	63

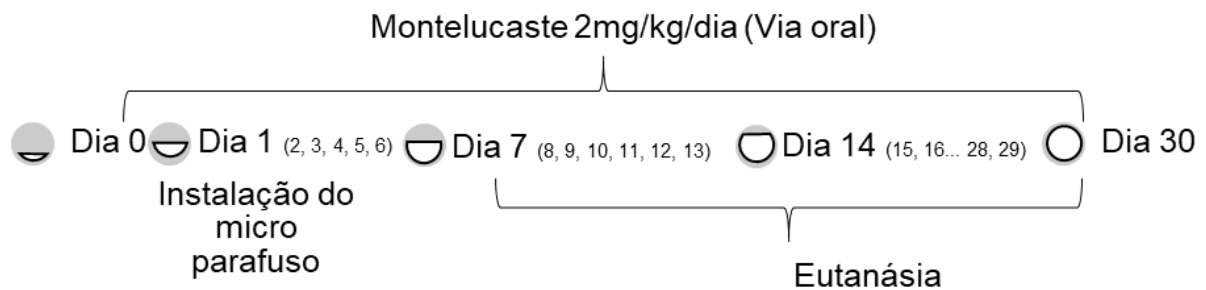
Fonte: Masocatto, 2022.

FIGURA 1 – Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais dos grupos Controle/WT e 5-LOKO



Fonte: Masocatto, 2022.

FIGURA 2 – Linha do tempo referente aos procedimentos experimentais do grupo MTK/WT



Fonte: Masocatto, 2022.

3.2 Animais de Experimentação

Perante aprovação do comitê de ética protocolo FOA nº 173-2019 (Anexo 1), os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais Especiais da FMRP/USP, o qual trabalha com animais previamente adquiridos do laboratório *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME USA). Foram utilizados 63 camundongos machos da linhagem 129/Sv, sendo 42 animais WT e 21 animais geneticamente deficientes e homozigotos para enzima 5-LO (Alox5^{tm1Fun/J}), de acordo com o método de mutação empregado (*TM*, *target mutation*).

Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/Unesp, durante todo o período experimental, em ambiente com

ciclo claro/escuro de 12/12 horas, e temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, receberam ração (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) e água *ad libitum* durante todo o experimento, exceto no período de 72 horas pós-operatório, a qual a ração foi triturada para não influenciar no processo de reparo.

3.3 Material de implantação

Foram utilizados micro parafusos de liga de titânio comercial (titânio – 6 alumínio – 4 vanádio, com 0.6 mm de diâmetro e 4.3 mm de ponta ativa - (NTI Kahla GmbH, Alemanha), sem nenhum tratamento de superfície (FIGURA 3), a fim de se observar o processo de reparo peri-implantar, sem interferências ou variáveis provenientes do biomaterial. A ponta ativa dos micro parafusos foram cortados ao meio (cerca de 2 mm de comprimento) e esterilizados através da autoclavagem, antes da sua instalação nos rebordos edêntulos dos animais. Estudo anterior demonstrou que o processo de esterilização não altera os componentes da superfície usinada deste material [7].

FIGURA 3 – Dimensões do micro parafuso de titânio



Fonte: Masocatto, 2022.

3.4 Tratamento – inibição farmacológica do CisLT1R

Para este estudo, foi utilizado um antagonista de alta afinidade pelo CisLT1R (Montelukast, MTK, CAYM-10008318 - Cayman Chemicals®) 1 dia antes da cirurgia, 1 hora pré-instalação do implante, durante todo o período experimental e 1 hora antes da eutanásia. O medicamento foi diluído em água destilada e

administrado no volume final 10 uL por VO utilizando uma pipeta, na qual a dosagem foi de 2mg/kg/dia.

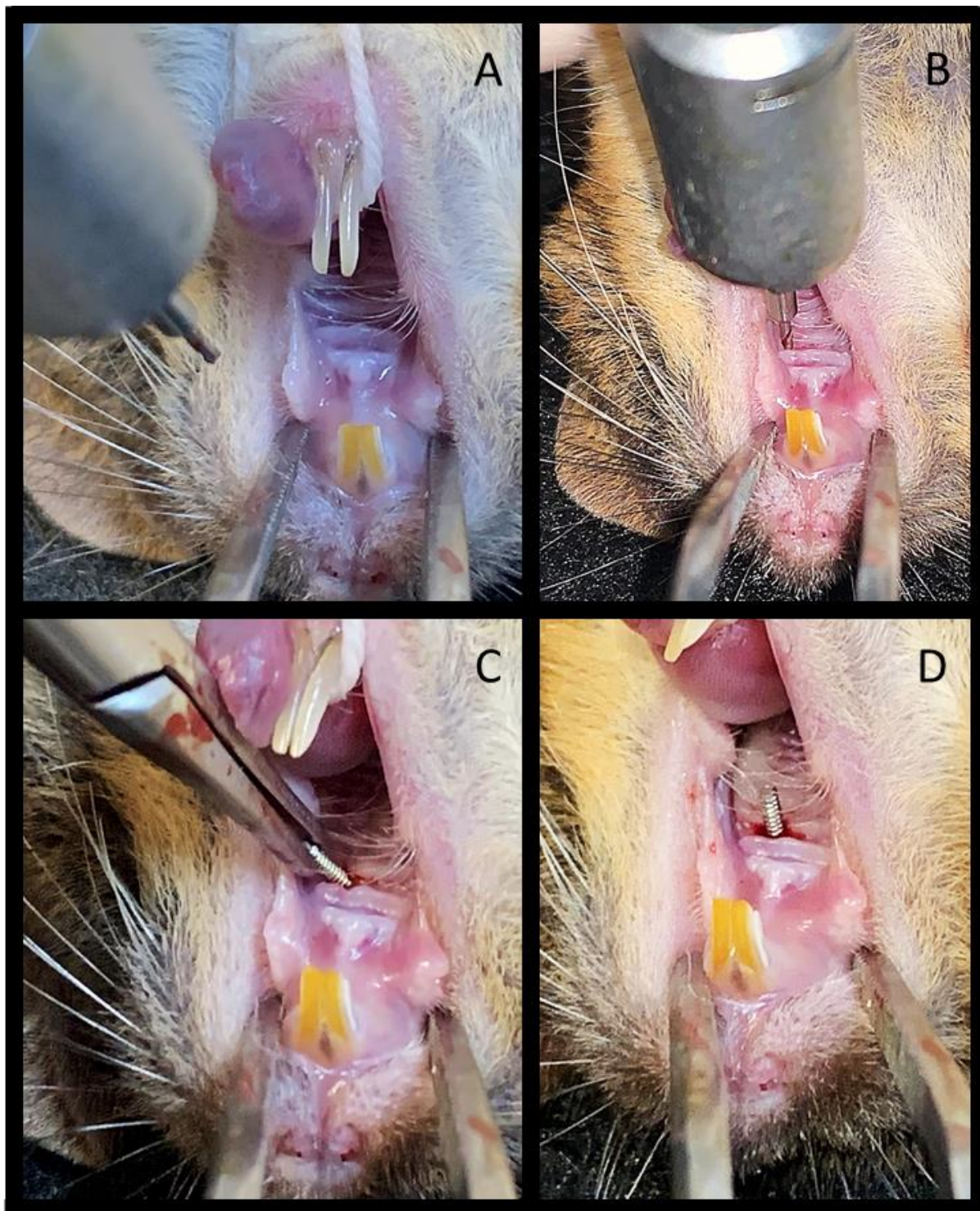
3.5 Procedimento cirúrgico para implantação dos dispositivos de Titânio

Os animais com idade variando entre 12 e 14 semanas e peso aproximado de 27g, foram submetidos à sedação profunda administrada via intraperitoneal (IP), utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina (75 mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Procedeu-se a antisepsia da cavidade bucal com polivinilpirrolidona (PVPI) 1% tópica (Dermoidine® - Gessy Lever Industrial Ltda.) e montagem dos campos cirúrgicos estéreis.

Com auxílio de uma lâmina de micro bisturi angular de 22,5° (n.10316 -14, Ferramentas de ciência fina®, Colúmbia Britânica, CA, EUA), foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 mm paralelamente à ruga palatina, imediatamente à frente do primeiro molar superior do lado esquerdo, seguido de descolamento mucoperiosteal com sonda exploradora nº 5 adaptada, a fim de expor o tecido ósseo para perfuração guia utilizando broca de 0,50 mm de diâmetro (NTI-Kahla GmbH Rotary Dental Instruments, Kahla, Alemanha). A velocidade de perfuração de 800 rpm, sob irrigação constante com solução fisiológica 0,9% refrigerada e estéril, para confeccionar o leito receptor.

Em seguida, os micro implantes foram aparafusados no leito cirúrgico, até o nível ósseo, com auxílio de um micro porta-agulha *Castro Viejo* (Fine Science Tools®, British Columbia, CA, EUA). O reparo tecidual para este modelo é obtido após 21 dias da instalação dos implantes, conforme estudos prévios [7, 27].

FIGURA 4 – Imagens representativas da cirurgia de instalação do micro parafuso de titânio. (A) Preparo do sítio cirúrgico, (B) perfuração guia com broca de 0,5 mm de diâmetro, (C) instalação do micro parafuso de titânio e (D) micro parafuso de titânio posicionado



Fonte: Masocatto, 2022.

3.6 Eutanásia, coleta, preparo e armazenamento de amostras

Ao final dos períodos experimentais, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de sobre dosagem de sedativo e relaxante muscular, e posteriormente, os espécimes contendo os sítios de implantação fixados em formol tamponado a 10% por 48 horas, lavados em água corrente por 8-12 horas.

3.7 Processamento histológico e métodos de coloração empregados

Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA 10% tamponado com pH 7,0 por um período aproximado de 3 semanas, sendo trocados 2 vezes na semana. Após a desmineralização, os micros parafusos de titânio foram cuidadosamente removidos e as peças incluídas em parafina (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido do longo eixo da região ocupada pelo implante, utilizando-se micrótomo Leica RM. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e para técnica de imunoistoquímica.

3.7.1 Análise histológica descritiva

Cortes histológicos do reparo peri-implantar foram corados com HE e capturados sob ampliação de 100x (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena). A análise histológica descritiva considerou-se infiltrado inflamatório, tecido de granulação, tecido conjuntivo, tecido ósseo não vital, formação, maturação e remodelação óssea.

3.7.2 Imunoistoquímica

Os cortes parafinados foram tratados com proteinase K por 30 minutos em temperatura ambiente para a recuperação antigênica, foi bloqueada a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados

em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foram utilizados os anticorpos policlonais primários anti-goat para a detecção de TRAP (SC#30832) e COX-2 (SC#1747) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz), em ambiente refrigerado por 1 hora, e lavados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Posteriormente, os cortes foram tratados com o polímero Immpress/HRP (Vector Labs, Southfield, EUA) por 10 a 25 minutos, em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra corados com hematoxilina de Harris. Para controle negativo foi omitido o anticorpo primário.

Cada lâmina forneceu 3 cortes do reparo peri-implantar de cada animal para a análise quantitativa de cada marcador. Os cortes foram analisados e capturados sob ampliação de 100x, com 2 campos por corte na região entre a 2ª e 4ª rosca do implante, no sentido cérvico-apical. (FIGURA 5). Após, utilizou-se o software ImageJ (Version 1.51, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) com uma grade com 120 pontos coincidentes para a quantificação de células marcadas positivas para TRAP e COX-2.

3.8 Análise estatística

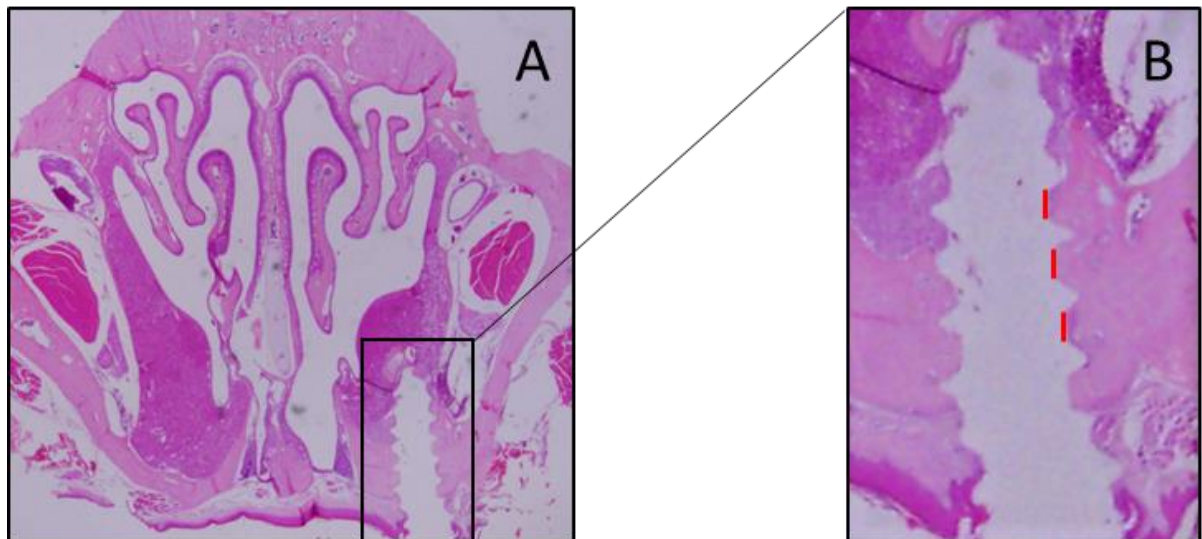
Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística pelo teste de normalidade de Kruskal Wallis seguido de Dunn com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no software Prisma (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica

As áreas de análise corresponderam ao tecido em contato com a superfície dos implantes entre as 2ª e 4ª roscas, no sentido cérvico-apical. (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Imagem ilustrativa para região de análise. (A) Imagem da lâmina de maxila na lente objetiva 2x. (B) Imagem aumentada da região do implante de titânio. Os traços vermelhos correspondem a superfície entre 2ª e 4ª rosca dos implantes, no sentido cérvico-apical (HE; A – aumento original 2x; B – aumento original 20x)



Fonte: Masocatto, 2022.

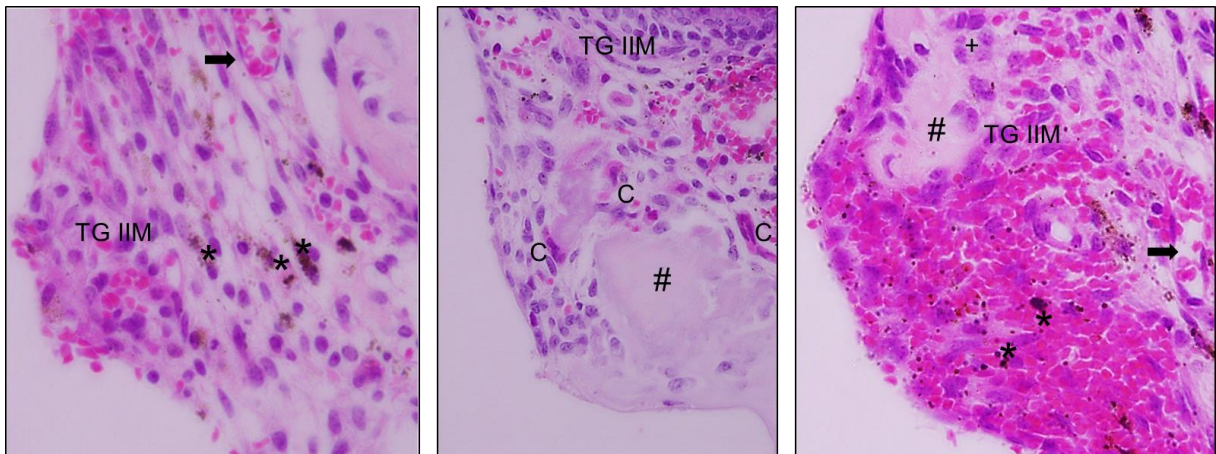
4.1.1 Análise histomorfométrica

4.1.1.1 Grupo Controle/WT

Aos 7 dias pós-operatório observou-se a presença de tecido de granulação ricamente celularizado com moderado infiltrado inflamatório mononuclear com destaque para as células macrofágicas, as quais mostravam citoplasma repleto de grânulos acastanhados, possivelmente decorrentes da presença do metal e focos de coágulo e vasos sanguíneos. Observaram-se áreas de tecido ósseo não vital e fragmentos de tecido ósseo maduro associados à atividade osteoclástica. Em meio a

estes eventos, nota-se atividade osteogênica com deposição de matriz óssea. (FIGURA 6)

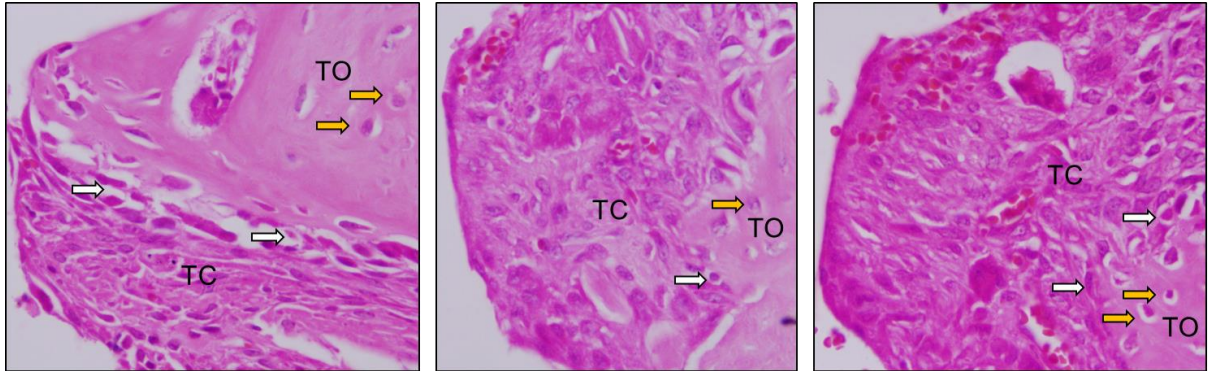
FIGURA 6 – Grupo Controle/WT 7D – Em contato com a superfície do implante observa-se tecido de granulação (TG) com moderado infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), com macrófagos com grânulos acastanhados (*), coágulo e vaso sanguíneo (seta preta), tecido ósseo não vital associado à atividade osteoclástica (#) e áreas de osteoclastogênese (+). (HE; aumento original de 100x)



Fonte: Masocatto, 2022.

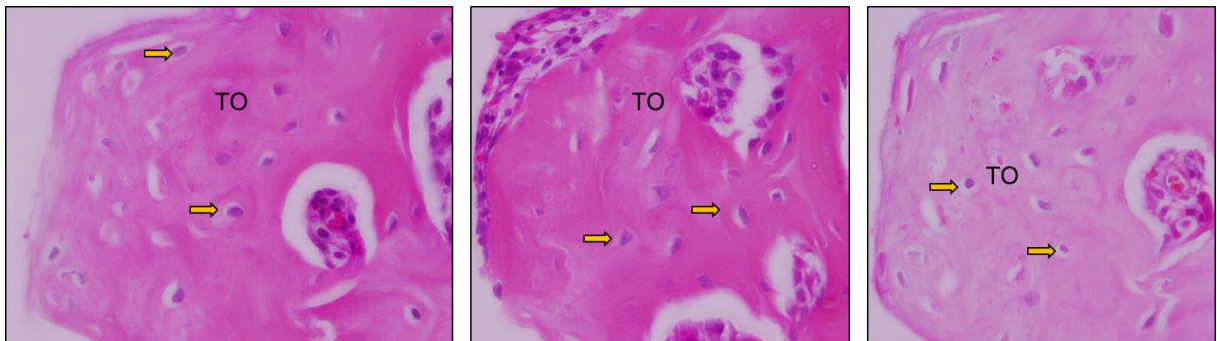
Aos 14 dias, observou-se ora tecido conjuntivo osteogênico, ricamente celularizado, ora predominância de tecido ósseo maduro, com focos de neoformação óssea caracterizada por matriz irregular rica em osteócitos, especialmente quando em contato com a superfície do implante. (FIGURA 7). No período de 30 dias, observou-se tecido ósseo maduro em remodelação. (FIGURA 8)

FIGURA 7 – Grupo Controle/WT 14D – Observa-se neoformação óssea em contato com a superfície do implante e entre o tecido ósseo maduro (TO) com osteócitos (seta amarela) e o tecido conjuntivo osteogênico (TC) com osteoblastos (seta branca). (HE; aumento original de 100x)



Fonte: Masocatto, 2022.

FIGURA 8 – Grupo Controle/WT 30D – Observa-se tecido ósseo maduro (TO) em processo de remodelação rico em osteócitos (seta amarela). (HE; aumento original de 100x)

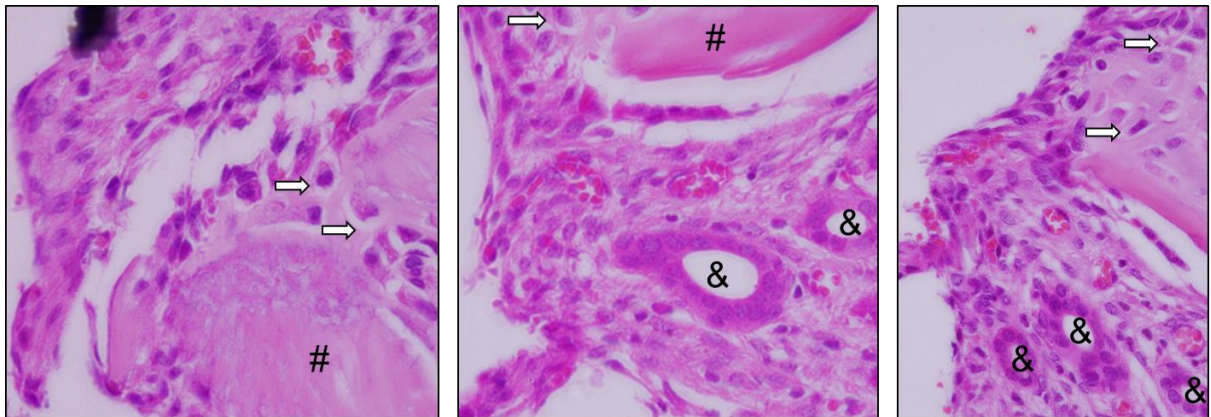


Fonte: Masocatto, 2002.

4.1.1.2 Grupo MTK/WT

Aos 7 dias exibiu intensa atividade osteoblástica com deposição de matriz óssea, na maioria das vezes, sobre a superfície dos fragmentos de tecido ósseo não-viáveis possivelmente resultantes do procedimento de fresagem. Subjacente, notou-se mucosa sinusal rica em glândulas serosas, com discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear neutrofílico e mononuclear. (FIGURA 9)

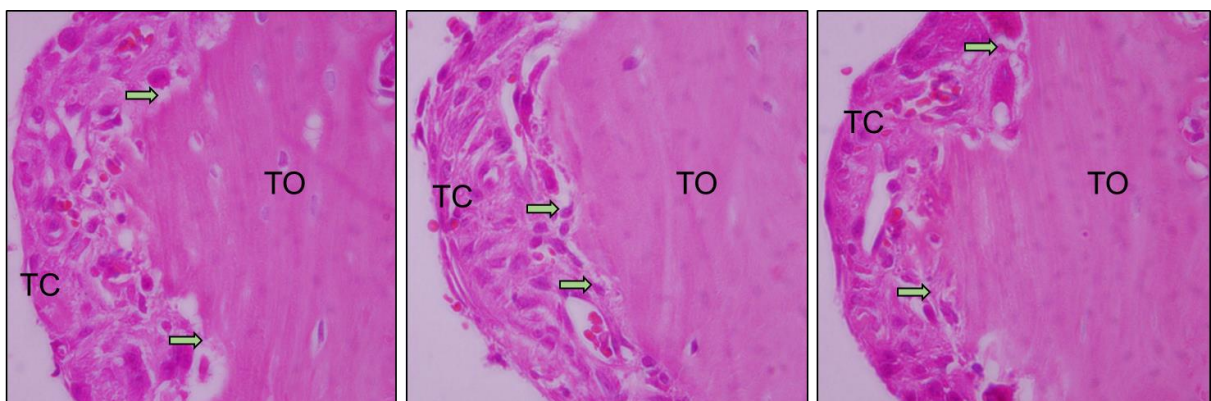
FIGURA 9 – Grupo MTK/WT 7D – Observa-se intensa atividade osteoblástica (seta branca), mucosa sinusal com glândulas serosas (&) e fragmentos ósseos não vitais (#). (HE; aumento original de 100x)



Fonte: Masocatto, 2022.

No período de 14 dias, observou-se predominância de tecido conjuntivo na superfície do implante, com regiões onde se verificou fina camada de tecido ósseo em remodelação. Eventualmente, também foi possível visualizar tecido ósseo maduro na região correspondente à porção apical do implante. (FIGURA 10)

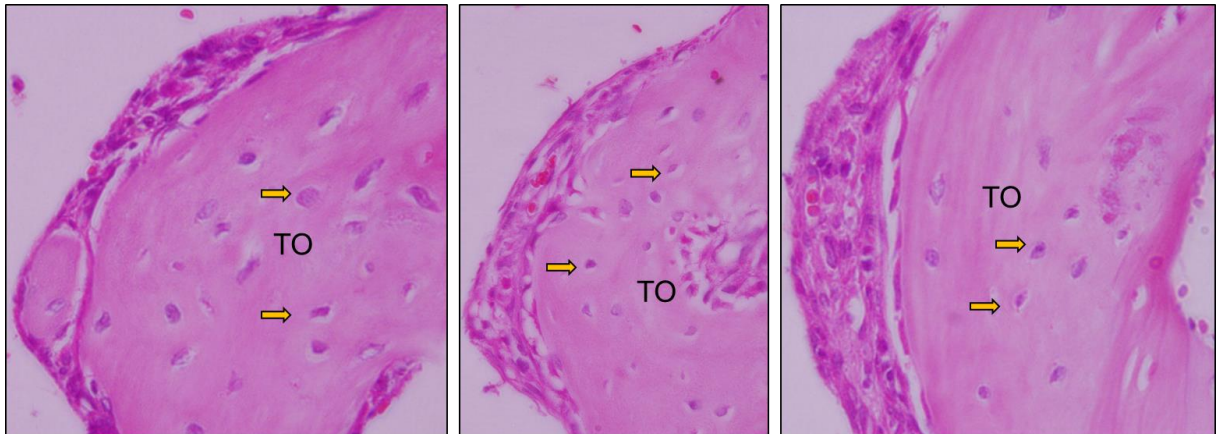
FIGURA 10 – Grupo MTK/WT 14D – Observa-se predominância de tecido conjuntivo osteogênico na superfície do implante (TC), região de remodelação óssea (seta verde) e tecido ósseo maduro (TO). (HE; aumento original de 100x)



Fonte: Masocatto, 2022.

Aos 30 dias, o tecido ósseo adjacente ao implante mostrava-se maduro, com pouca atividade de remodelação, podendo ser observado também na região do terço apical do implante. (FIGURA 11)

FIGURA 11 – Grupo MTK/WT 30D – Observa-se tecido ósseo maduro (TO) com osteócitos (seta amarela) e discreta atividade de remodelação. (HE; aumento original de 100x)

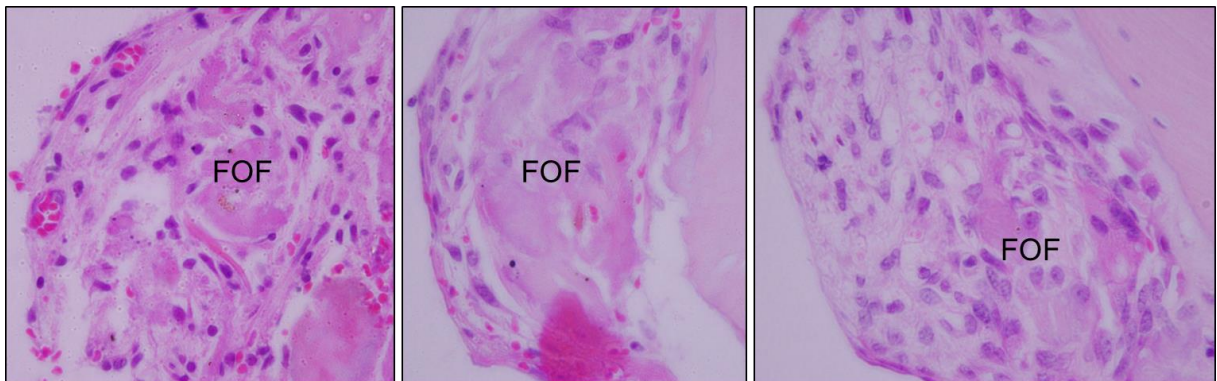


Fonte: Masocatto, 2022.

4.1.1.3 Grupo 5-LOKO

Aos 7 dias apresentaram formação óssea focal irregular próxima à superfície do implante. (FIGURA 12)

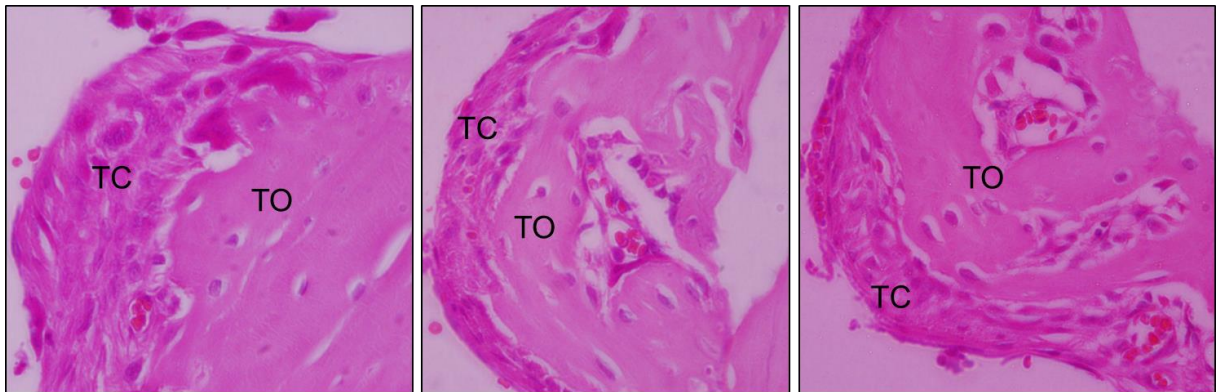
FIGURA 12 – Grupo 5-LOKO 7D – Observa-se formação óssea focal irregular (FOF). (HE; aumento original de 100x)



Fonte: Masocatto, 2022.

Aos 14 dias, notou-se ora tecido ósseo maduro em remodelação, ora fina camada de tecido conjuntivo ricamente celularizado e vascularizado, com atividade osteogênica. (FIGURA 13)

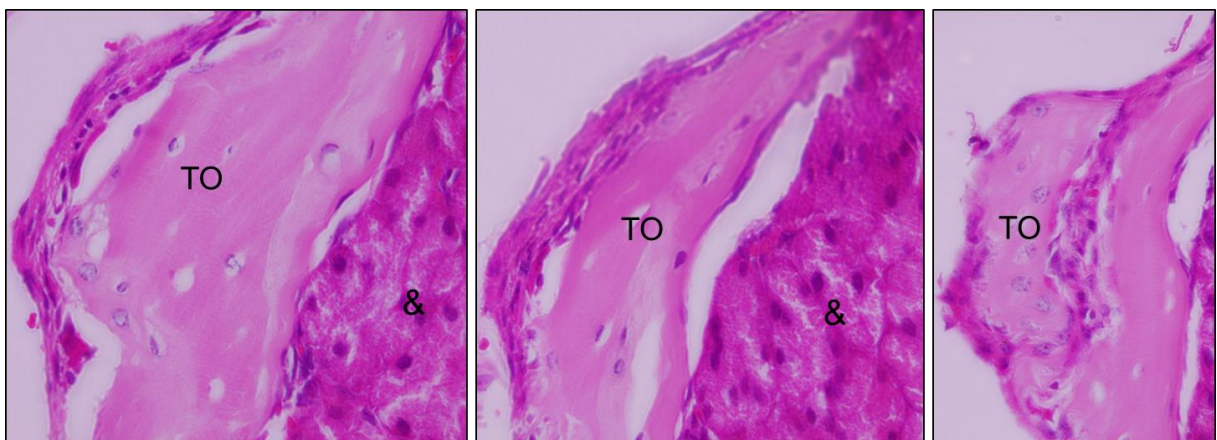
FIGURA 13 – Grupo 5-LOKO 14D - Observa-se tecido ósseo maduro (TO) em remodelação e tecido conjuntivo osteogênico (TC). (HE; aumento original de 100x)



Fonte: Masocatto, 2022.

No período de 30 dias, observa-se em contato com o implante, áreas com predomínio de tecido ósseo maduro, com pouca atividade de remodelação, intercaladas pela presença de mucosa sinusal. (FIGURA 14)

FIGURA 14 – Grupo 5-LOKO 30D – Observa-se tecido ósseo maduro (TO) com pouca remodelação e presença de mucosa sinusal (&). (HE; aumento original de 100x)



Fonte: Masocatto, 2022.

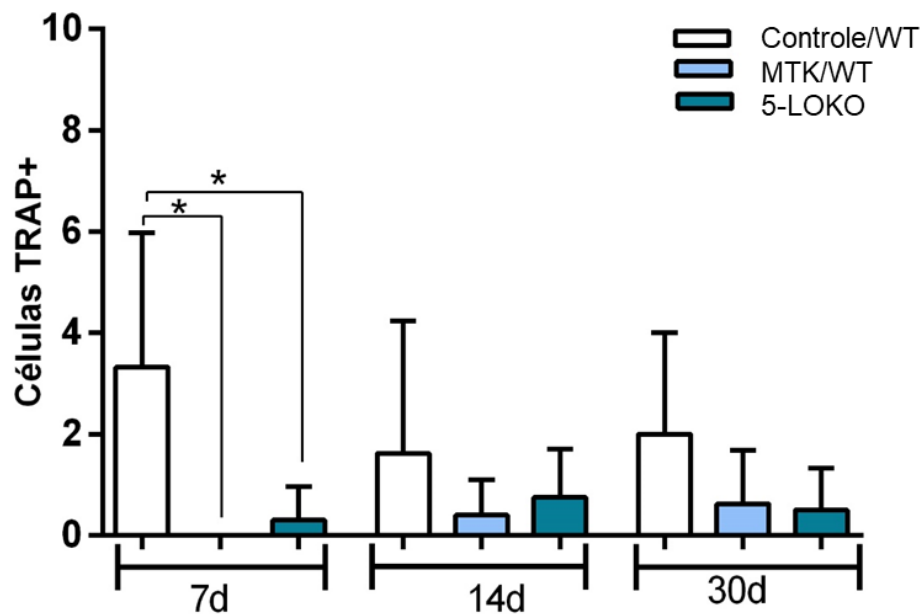
4.2 Análise imuno-histoquímica

As imunomarcações para TRAP e COX-2 foram analisadas nas mesmas regiões determinadas para a histomorfometria dos cortes em HE (FIGURA 5).

4.2.1 TRAP

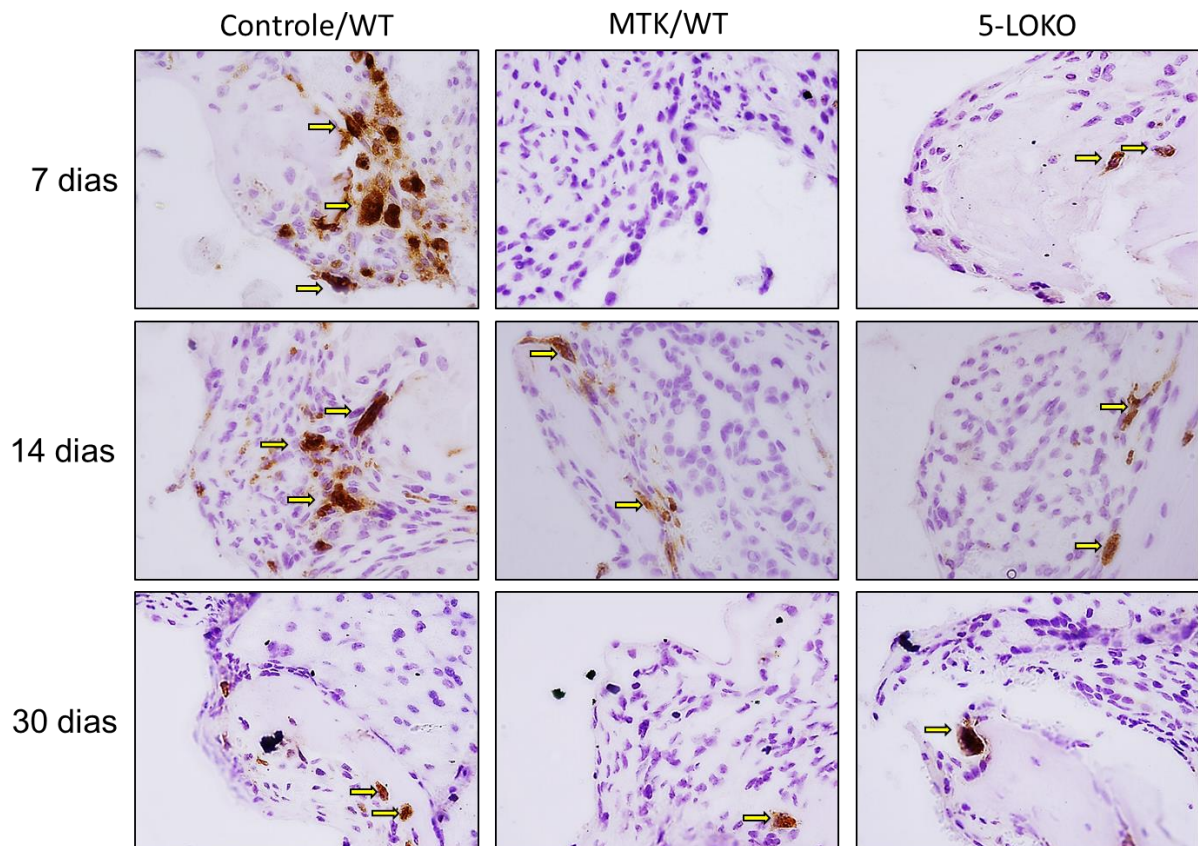
Aos 7 dias os grupos MTK e 5-LOKO apresentaram menor número de células imunopositivas para TRAP ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo Controle/WT. Porém, aos 14 e 30 dias não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). (GRÁFICO 1 e FIGURA 15)

GRÁFICO 1 – Resultado da imunomarcação positiva para TRAP entre todos os grupos e períodos. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo período ($p < 0,05$)



Fonte: Cláudia Biguetti, 2022.

FIGURA 15 – As setas indicam células imunomarcadas para TRAP (aumento original 100x).

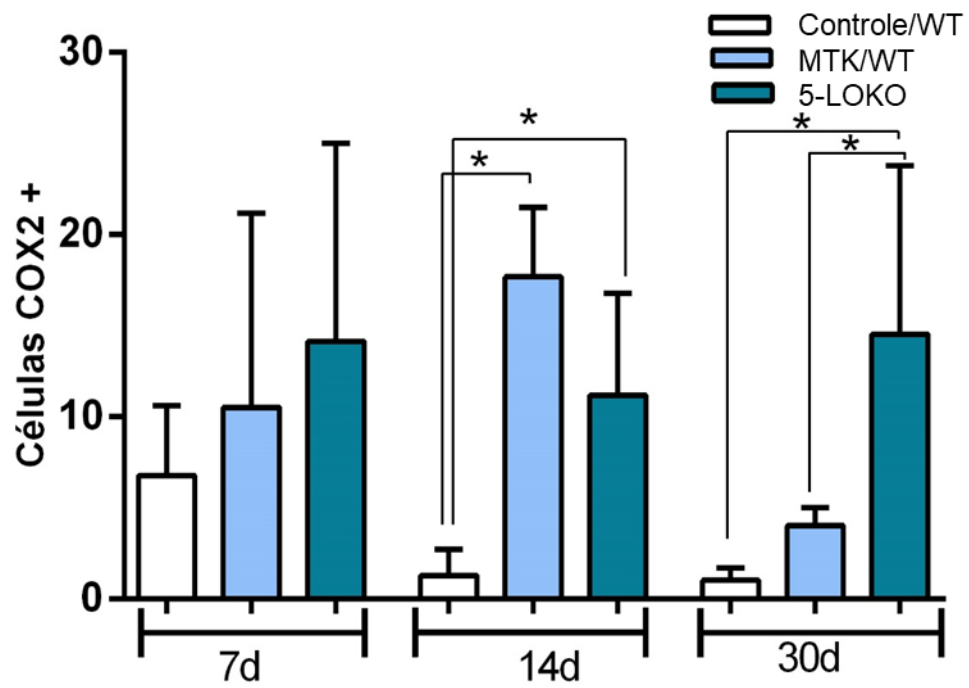


Fonte: Masocatto, 2022.

4.2.2 COX-2

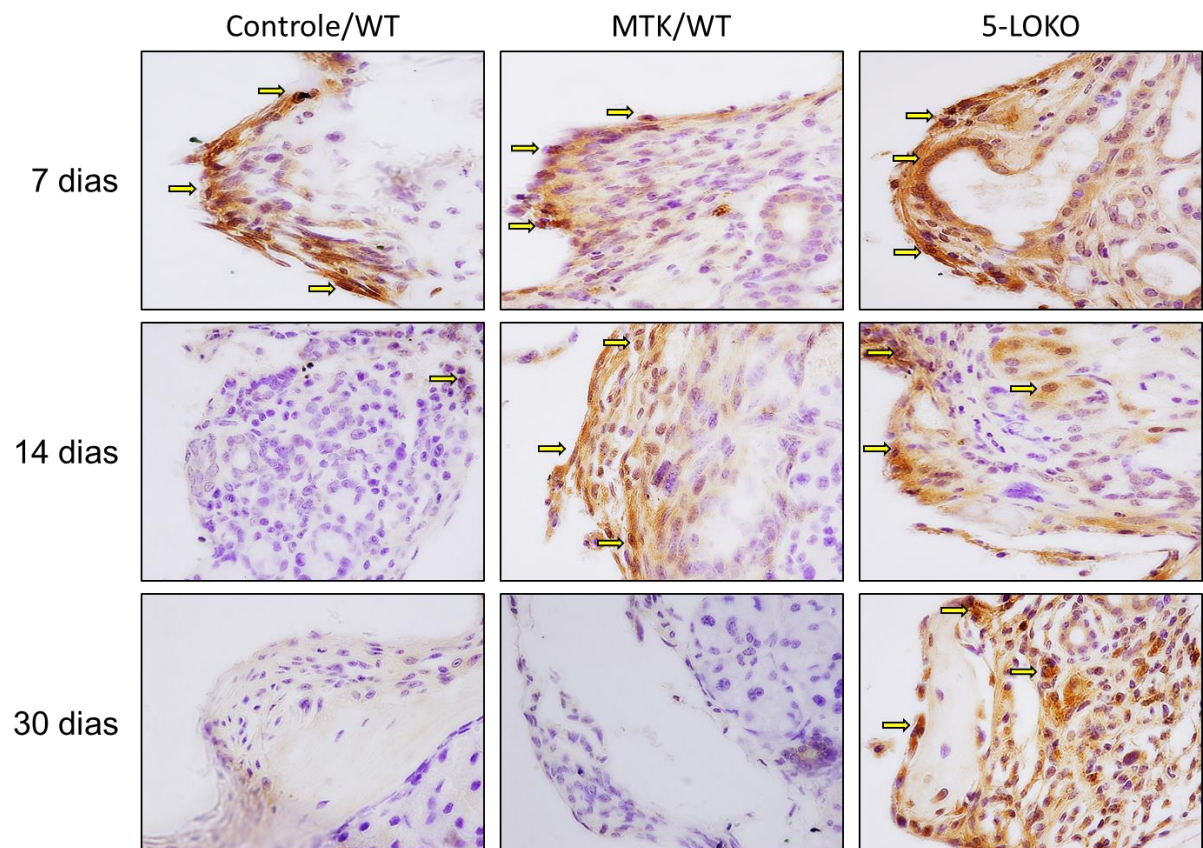
Aos 7 dias não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Porém, aos 14 dias, os grupos MTK/WT e 5-LOKO apresentaram maior número de células imunomarcadas para COX-2, quando comparado com o grupo Controle/WT ($p < 0,05$). Aos 30 dias, o grupo 5-LOKO apresentou maior número de células imunomarcadas para COX-2, quando comparado com os grupos MTK/WT e Controle/WT ($p < 0,05$). (GRÁFICO 2 e FIGURA 16)

GRÁFICO 2 – Resultado da imunomarcação positiva para COX-2 entre todos os grupos e períodos. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo período ($p < 0,05$)



Fonte: Cláudia Biguetti, 2022.

FIGURA 16 - As setas indicam células imunomarcadas para COX-2 (aumento original 100x).



Fonte: Masocatto, 2022.

5 DISCUSSÃO

Os implantes dentais são considerados dispositivos reabilitadores/protéticos de sucesso, pois, substituem o dente perdido e devolve função e estética com baixas taxas de falhas [27]. A maioria dos estudos experimentais com animais sobre osseointegração são realizados em ossos longos e não na maxila e mandíbula [7, 27]. Mouraret et al. [27] utilizaram modelo animal e observaram que os ossos craniofaciais e longos apresentaram diferentes taxas de cicatrização em defeitos ósseos de 0,5 mm em maxila e 1 mm em tíbia. Mesmo com o tamanho reduzido, aos 14 dias a cicatrização da maxila apresentou tecido conjuntivo fibroso e, na tíbia, tecido ósseo neoformado, com isso, os ossos craniofaciais tenderam a cicatrizar mais lentamente do que os ossos longos em lesões similares.

O presente estudo avaliou os efeitos da inibição do CisLT1R pelo MTK e da enzima 5-LO por modificação genética sobre o processo de reparo peri-implantar em camundongos. Dessa forma, propusemo-nos a investigar os efeitos da inibição do CisTLR1, bem como a ausência do gene da 5-LO no processo de reparo ao redor de implantes em maxila. Observamos que os animais tratados com MTK e os 5-LOKO apresentaram formação precoce de tecido ósseo, maior quantidade de células imunomarcadas positivas para COX-2 e menor para TRAP, quando comparados com animais do grupo Controle/WT.

Na análise histológica qualitativa, a deposição óssea peri-implantar nos grupos MTK/WT e 5-LOKO foi precoce quando comparada com o grupo Controle/WT. Aos 7 dias pós-operatório, no grupo Controle/WT observamos moderado infiltrado inflamatório mononuclear e atividade osteoclástica. Enquanto no grupo MTK/WT e 5-LOKO observamos trabéculas ósseas e atividade osteoblástica com deposição de matriz óssea. No 5-LOKO as trabéculas estavam mais organizadas e com formação óssea difusa próxima a superfície do implante.

Em seguida, ficou evidente que aos 14 dias, os grupos MTK/WT e 5-LOKO já apresentavam tecido ósseo em remodelação com tecido conjuntivo osteogênico na superfície do implante e, no Controle/WT neoformação óssea com matriz irregular em meio ao tecido conjuntivo osteogênico difuso. Por fim, aos 30

dias, em todos os grupos observamos tecido ósseo maduro peri-implantar, contudo, o Controle/WT encontrava-se em remodelação.

Wixted et al. [4] estudaram o efeito do MTK (1,5 mg/kg/dia) no reparo de fratura de fêmur em camundongos e observaram aos 7 e 10 dias pós-fratura maior calo ósseo e formação óssea precoce quando comparados com o grupo controle. Bonewald et al. [21] e Manigrasso e O'Connor [20] demonstraram por meio de estudos com camundongos 5-LOKO, um fenótipo ósseo com espessamento da cortical e processo de reparo mais acelerado de fratura de fêmur nestes animais comparados a camundongos WT. Contudo, Simionato et al. [25] não observaram o mesmo fenótipo de corticais mais espessas em ossos craniofaciais de camundongos com deleção do gene para 5-LO, avaliaram o reparo alveolar pós-exodontia e observaram que os mesmos animais apresentaram cicatrização precoce, com alvéolos totalmente preenchidos por trabéculas maduras aos 14 dias. Sendo assim, esses estudos corroboram com nossos achados, podendo sugerir que o MTK e a ausência do gene para a 5-LO em ossos longos e craniofaciais aceleram o processo de reparo ósseo.

Embora o esqueleto seja considerado como uma estrutura única, há diferenças embrionárias entre os ossos de ossificação intramembranosa e endocondral [25, 27]. Na embriogênese, as células formadoras de osso, os osteoblastos, se originam das células mesenquimais da crista neural e do mesoderma para formar os ossos craniofaciais e longos, respectivamente. Sendo assim, há características de sítio-específico das células ósseas e o comportamento biológico, homeostase e a regeneração/remodelação são diferentes em locais distintos do esqueleto. A cicatrização óssea da cavidade oral é mais complexa do que em ossos longos, pois este possui grande cavidade medular pró-osteogênica e facilita a rápida neoformação óssea [25, 27].

Na avaliação histológica observamos em algumas lâminas a presença de mucosa sinusal com glândulas serosas e fragmentos ósseos sem vitalidade. Tais características também foram observadas por Mouraret et al. [27], pois, a maioria dos implantes em maxilas dos camundongos ficaram em íntimo contato com o epitélio olfatório. Com isso, não houve comprometimento na osseointegração e os fibroblastos infiltraram o epitélio, aderiram ao implante e formaram osso sob o tecido

fibroso. Também relataram que os fragmentos ósseos não vitais forneceram suporte ósseo mecânico para o implante recém colocado e em fases posteriores seriam reabsorvidos por osteoclastos. Como na maxila não há espaço medular, os autores colocaram como provável fonte de osteoblastos para a neoformação óssea o periósteo de osso vital adjacente ao sítio cirúrgico [27].

O mecanismo de reabsorção óssea também apresenta especificidade de sítio. Os osteoclastos dos ossos intramembranosos secretam TRAP e metaloproteinases e dos endocondrais secretam catepsina K para a acidificação do compartimento sub osteoclástico e degradação da matriz óssea [28]. Os osteoclastos se originam de células da linhagem mieloide, dos monócitos, que chegam até o osso através da circulação sanguínea. Para a formação de osteoclastos funcionais, os osteoblastos e osteócitos expressam dois fatores: o estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANKL), que são importantes para a sobrevivência, diferenciação, maturação e ativação dos osteoclastos [1-4, 25].

Estudos *in vitro*, os macrófagos derivados da medula óssea de camundongos e incubados em meio de cultura com M-CSF e RANKL induziram a formação de osteoclastos positivos para a TRAP. Por outro lado, o tratamento da mesma cultura com MTK inibiu completamente os osteoclastos, em virtude de alterações morfológicas [1, 3]. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram que o MTK também diminuía a expressão de TRAP, formação de osteoclastos e a reabsorção em modelos experimentais de ovariectomia, movimentação ortodôntica, sepse e periodontite experimental [1-4, 24, 26].

Moura et al. [2] também observaram que a ausência do gene para 5-LO e o MTK reduziram o número de células positivas para TRAP quando comparados com seus respectivos controles. Como esperado, no presente estudo observamos diminuição significativa na imunomarcação de células positivas para TRAP nos grupos MTK/WT e 5-LOKO, 7 dias pós-operatório, quando comparados com o Controle/WT no mesmo período e apesar de não haver diferença significativa, a expressão de TRAP manteve-se baixa aos 14 e 30 dias dos períodos de análise. No grupo Controle/WT 7 dias observamos pico de células positivas para TRAP, que revela marcação de osteoclastogênese, como indicado na análise histológica aos 7

dias do presente estudo. Assim, podemos sugerir que o MTK e a ausência da 5-LO interferem na formação de osteoclasto durante o processo de cicatrização óssea.

As citocinas e mediadores inflamatórios são fundamentais na resposta inicial da regeneração óssea, pois regulam o recrutamento e diferenciação dos osteoclastos e osteoblastos [1-4, 25]. Qualquer dano tecidual através da fosfolipase A2, libera o AA dos fosfolípidios da membrana celular, que é metabolizado pela COX para a produção de PGs e pela 5-LO para a produção de LTs e CisLTs [2, 28]. Estudos mostraram que esses mediadores lipídicos produzem efeitos opostos na regeneração óssea. As PGs apresentam efeitos positivos na diferenciação dos osteoblastos e formação óssea. Já os LTs e CisLTs estimulam a atividade osteoclástica e reabsorção óssea. Neste sentido, a manipulação farmacológica das vias do AA pode ser um meio para acelerar e melhorar a regeneração óssea [4].

No presente estudo, na imunomarcagem de células positivas para COX-2, observamos aumento significativo nos grupos MTK/WT e 5-LOKO aos 14 dias e manteve-se aumentada aos 30 dias somente no grupo 5-LOKO. Apesar de não haver diferenças significativas aos 7 dias, ambos os grupos apresentaram mais células positivas para COX-2 que o grupo Controle/WT. Manigrasso e O'Connor [20] e O'Connor et al. [17] observaram que a ausência dos genes para 5-LO e COX-2 geraram efeitos opostos; um acelerou e aumentou a formação óssea e a expressão da COX-2 e o outro atrasou a cicatrização óssea por desviar o AA para a via 5-LO e consequentemente, aumentou a produção de LTs e CisLTs. Referente a tal achado, podemos sugerir que a inibição da 5-LO e do CisLT1R pelo MTK desviam o AA para a via COX e aceleram a neoformação óssea peri-implantar.

No presente estudo, os camundongos receberam doses de MTK mais de 10 vezes maiores (2 mg/kg/dia) que as utilizadas em humanos (0,15 mg/kg/dia). Similarmente, em outros estudos publicados, as doses de MTK variaram de 1,5 a 14 mg/kg/dia VO ou de 30 mg/kg 2 vezes na semana IP. Altas doses do medicamento podem antagonizar o CisLT1R bem como inibir a 5-LO [1-4, 24]. Além do efeito positivo no metabolismo ósseo, estudos mostraram uma série de atividades anti-inflamatórias secundárias na sepse, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal e acidente vascular cerebral [3, 24, 26].

Em contraste, Cakici et al. [29] observaram que as doses de 1 mg/kg/dia IP não apresentaram nenhum efeito na cicatrização de fratura de tíbia. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) inibem a COX e são rotineiramente usados no reparo de fraturas para controle da dor e edema. Estudos em animais mostram que a inibição de prostaglandinas pelos AINES resulta em retardo na cicatrização óssea. Porém, estudos em humanos evidenciam que não há riscos significativos de sequelas ósseas [4, 30].

Atualmente, este medicamento é o mais utilizado mundialmente para o tratamento de asma e rinite alérgica, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), mostra-se seguro e eficaz em humanos. Sendo assim, novos estudos serão úteis não apenas na área da odontologia, mas também para a área da medicina. Nossos achados sobre o MTK nos encorajam a reproduzir novos estudos, como em casos de patologias que retardam a cicatrização óssea, diabetes, osteoporose, senilidade, bem como na regeneração óssea guiada.

6 CONCLUSÃO

A inibição do CisLT1R pelo MTK, bem como a ausência do gene para a 5-LO aceleraram o processo de reparação óssea peri-implantar oral no presente modelo experimental.

REFERÊNCIAS

1. Zheng C, Shi X. Cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46:S64-70.
2. Moura AP, Taddei SR, Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Rodrigues LF, Garlet GP, et al. The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. *Bone.* 2014 Dec;69:133-8.
3. Kang JH, Lim H, Lee DS, Yim M. Montelukast inhibits RANKL-induced osteoclast formation and bone loss via CysLTR1 and P2Y12. *Mol Med Rep.* 2018 Aug;18(2):2387-98.
4. Wixted JJ, Fanning PJ, Gaur T, O'Connell SL, Silva J, Mason-Savas A, et al. Enhanced fracture repair by leukotriene antagonism is characterized by increased chondrocyte proliferation and early bone formation: a novel role of the cysteinyl LT-1 receptor. *J Cell Physiol.* 2009 Oct;221(1):31-9.
5. Jayesh RS, Dhinakarsamy V. Osseointegration. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015 Apr;7(Suppl 1):S226-9.
6. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014 Apr;16(2):155-65.
7. Bigueti CC, Cavalla F, Silveira EM, Fonseca AC, Vieira AE, Tabanez AP, et al. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170601.
8. Othman Z, Cillero Pastor B, van Rijt S, Habibovic P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. *Biomaterials.* 2018 Mar;167:191-204.
9. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003 Aug;67(8):932-49.

10. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 2014 Jul;10(7):2907-18.
11. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981 Dec;10(6):387-416.
12. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 Jun;14(2):179-86.
13. Santiago Junior JF, Bigueti CC, Matsumoto MA, Abu Halawa Kudo G, Parra da Silva RB, Pinto Saraiva P, et al. Can genetic factors compromise the success of dental implants? A systematic review and meta-analysis. *Genes.* 2018 Sep;9(9):444.
14. Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Mar;24(2):195-201.
15. Moreschi E, Bigueti CC, Comparim E, De Andrade Holgado L, Ribeiro-Junior PD, Nary-Filho H, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition does not impair block bone grafts healing in rabbit model. *J Mol Histol.* 2013 Dec;44(6):723-31.
16. Matsumoto MA, De Oliveira A, Ribeiro Junior PD, Nary Filho H, Ribeiro DA. Short-term administration of non-selective and selective COX-2 NSAIDs do not interfere with bone repair in rats. *J Mol Histol.* 2008 Aug;39(4):381-7.
17. O'Connor JP, Manigrasso MB, Kim BD, Subramanian S. Fracture healing and lipid mediators. *Bonekey Rep.* 2014;3:517.
18. Poveda Roda R, Bagan JV, Jimenez Soriano Y, Gallud Romero L. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs in dental practice. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007 Jan;12(1):E10-8.
19. Lin HN, O'Connor JP. Immunohistochemical localization of key arachidonic acid metabolism enzymes during fracture healing in mice. *PloS One.* 2014;9(2):e88423.
20. Manigrasso MB, O'Connor JP. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. *Acta Orthop.* 2010 Dec;81(6):748-55.

21. 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.
22. Simon AM, O'Connor JP. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Mar;89(3):500-11.
23. Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, et al. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1996 Nov;11(11):1619-27.
24. Moro MG, Oliveira MDS, Santana MM, de Jesus FN, Feitosa K, Teixeira SA, et al. Leukotriene receptor antagonist reduces inflammation and alveolar bone loss in a rat model of experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2021 Aug;92(8):e84-93.
25. Simionato GB, da Silva ACR, Oliva AH, de Abreu Furquim EM, Couto MCR, Shinohara AL, et al. Lack of 5-lipoxygenase in intramembranous and endochondral 129Sv mice skeleton and intramembranous healing. *Arch Oral Biol.* 2021 Nov;131:105266.
26. Tintinger GR, Feldman C, Theron AJ, Anderson R. Montelukast: more than a cysteinyl leukotriene receptor antagonist? *ScientificWorldJournal.* 2010 Dec;10:2403-13.
27. Mouraret S, Hunter DJ, Bardet C, Brunski JB, Bouchard P, Helms JA. A pre-clinical murine model of oral implant osseointegration. *Bone.* 2014 Jan;58:177-84.
28. Kierszenbaum AL. Tecido conjuntivo. In: Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia.* Rio de Janeiro: Elsevier Science; 2016. p. 123-59.
29. Cakıcı H, Hapa O, Gideroğlu K, Ozturan K, Güven M, Yüksel HY, et al. The effects of leukotriene receptor antagonist montelukast on histological, radiological and densitometric parameters of fracture healing. *Eklem Hastalik Cerrahisi.* 2011;22(1):43-7.

30. Kurmis AP, Kurmis TP, O'Brien JX, Dalén T. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drug administration on acute phase fracture-healing: a review. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 May;94(9):815-23.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Influência da enzima 5-LO sobre o processo de osseointegração", Processo FOA nº 00173-2019, sob responsabilidade de Mariza Akemi Matsumoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 10 de Abril de 2019.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 06 de Maio de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 06 de Junho de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Influence of 5-LO enzyme on osseointegration process", Protocol FOA nº 00173-2019, under the supervision of Mariza Akemi Matsumoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 10, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 06, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 06, 2021


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Via Mendonça - CEP: 16016-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone: (18) 3636-3234 Email: CEUA@foba.unesp.br