



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

**KIM HENDERSON CARMO RIBEIRO**

**Efeito tempo-dose-resposta do montelucaste no processo  
de reparo alveolar em camundongos 129Sv/Ev**

Araçatuba - SP  
2021

**KIM HENDERSON CARMO RIBEIRO**

**Efeito tempo-dose-resposta do montelucaste no  
processo de reparo alveolar em camundongos  
129Sv/Ev**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre do Programa de Odontologia, Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientadora: Prof. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientadores: Dra. Cláudia Cristina Biguetti

Prof. Ass. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto

Araçatuba - SP  
2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R289e Ribeiro, Kim Henderson Carmo.  
Efeito tempo-dose-resposta do montelucaste no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos 129Sv/Ev / Kim Henderson Carmo Ribeiro. . – Araçatuba, 2021  
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto  
Coorientadora: Profa. Cláudia Cristina Biguetti  
Coorientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto

1. Camundongos 2. Leucotrienos 3. Receptores do Leucotrieno B4 4. Regeneração óssea 5. Alvéolo dental I. T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

**Pai e Mãe**, que nunca fraquejaram diante das adversidades, que não foram poucas, para me direcionar no melhor caminho e oferecerem tudo o que puderam. O maior orgulho para mim foi tê-los como exemplo de luta, de renúncia e abnegação. Foram tantas as batalhas e vitórias de vocês que qualquer conquista minha representa um grão de areia no oceano da trajetória de vocês - dedico a vocês os méritos desse título.

**À meu avô Mário** (*in memoriam*), que estava vibrando junto a mim, esta batalha, como se navegasse os sete mares, mas infelizmente assistirá à esta conquista de camarote ao lado da nossa querida "mozinho". Obrigada pelo apoio e por ser uma referência para mim em tudo que realizo - Vô, lhe amarei para toda eternidade

**À minha avó Lourdes**, por todo apoio, por todo amor, por ser um exemplo de pessoa para mim, dedico à você os méritos desse título, pois sem a snhora isto não seria possível.

**À meu irmão Ian**, cuja melhor forma para resumi-lo é dizendo que sempre foi e continua sendo meu maior exemplo de amor, com o seu amor incondicional, a sua dedicação a toda sua família e seus filhos. É a pessoa, sem nenhuma dúvida, que mais se orgulha das minhas conquistas e que mais se realiza com o meu bem-estar e sucesso profissional – Maninho, saiba que em nenhum momento da minha vida eu me senti sozinha e nem desamparada, tamanha é a segurança que o seu amor me dá.

**Aos meus sobrinhos, Ana e Helsinho**, sem vocês faltaria garra, tudo do que realizei desde os seus nascimentos foram movidos ao amor que tenho por vocês.

**A meu amigo Lean** (*in memoriam*), meu irmão, minha eterna dupla, dedico este título a você que sempre foi minha metade, meu braço direito e esquerdo e com quem dividi os anos de graduação, conhecimentos, diploma e a vida. – Te amo sempre.

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

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

**À minha orientadora Mariza Akemi Matsumoto**, obrigada por ter me acolhido tão prontamente, mesmo quando eu caí aqui de paraquedas, apenas com experiências clínicas e nada de pesquisa, e por ter me amparado sempre. Pessoa que admiro e respeito, amiga para todos os momentos. Como profissional, um exemplo de seriedade, comprometimento, competência, dedicação e principalmente ética para com o ensino a pesquisa e alunos. Que Deus possa recompensar com saúde para você e sua família por todo o bem que distribui. Você é especialmente iluminada. Minha gratidão pelo incentivo e apoio. Obrigada por tudo.

**À minha co-orientadora Cláudia Cristina Bigueti**, que no decorrer destes dois anos tornou-se uma amiga de tantas confidências e desabafos, mas que também muito me ensinou e encorajou a continuar. Obrigada pela paciência de ensinar a me tornar um pouquinho cientista. Você foi muito paciente, sempre tendo muito cuidado comigo e se dedicando com amor a me orientar e aos nossos experimentos. Claudinha, eu te considero uma profissional fora de série e que realmente faz a diferença na ciência, colaborando e construindo conhecimentos. Você já percorreu uma carreira brilhante até aqui, frutos do seu merecimento, e eu vibro muito com cada vitória sua. Lhe admiro. E obrigada pelo seu apoio constante.

**Ao professor Antonio Hernandes Chaves Neto, meu co-orientador**, que aceitou este convite no meio da partida, para abraçar nossas idéias. Obrigada pela paciência de ensinar e me deixar vivenciar um pouco o mundo da bioquímica, o qual eu tanto amei. Obrigada pela dedicação a me orientar, e aos nossos experimentos. Sua contribuição foi imensa. O senhor é uma pessoa e um profissional honrável, lhe admiro imensamente. Muito obrigada!

**Aos colegas do grupo de pesquisa e alunos de iniciação científica**, André Oliva, Raquel Parra da Silva, Vinicius Rosa, Danilo Masocatto, Nataira Momesso, Ramez Mahamoud, Ana Carolina Bacelar, Gustavo Simionatto, Ana Becher, Ana Júlia, Juliana, Elisa Furquim, Ana Cláudia, pelo trabalho em equipe e nas atividades de laboratório e biotério. Me sinto muito agradecida e lisonjeada por estar no meio de vocês. Que Deus permita a cada um de vocês colher os frutos de tantas horas dedicadas aos estudos e aos trabalhos acadêmicos.

## **AGRADECIMENTOS**

**À FAPEAM**, Processo no 42338.63998.1205.2019 – Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), pelo apoio financeiro concesso em forma de bolsa, fundamental para a realização do meu mestrado.

**À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP**, por todo apoio e acolhimento. Obrigada à todos os funcionários, diretor Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

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

**Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia**, através dos professores Idelmo Rangel Garcia Júnior, Leonardo Perez Faverani, Francisley Ávila Souza, Ana Paula Bassi, Osvaldo Magro Filho, Daniela Ponzoni, pelo apoio e convivência enriquecedora.

**Ao Departamento de Fisiologia**, pela disponibilização do biotério e laboratório.

**À Faculdade de Odontologia de Bauru - USP**, especialmente ao Departamento de Materiais Dentários e Endodontia e **ao professor André Luis Shinohara** pela disponibilidade do Laboratório de Anatomia.

**Aos hospitais Santa Casa Saúde de Araçatuba, UNIMED Araçatuba e UNIMED Birigui**, onde pude vivenciar mais experiências hospitalares e desenvolver cirurgias que foram enriquecedoras para minha formação de Mestre.

**Ao Professor Wilson Roberto Poi**, por todo ensinamento durante as aulas, o senhor foi e sempre será uma grande inspiração para mim. Obrigada por todas as palavras de apoio, incentivo e conselhos pós aula também. Lembrarei sempre de suas

palavras, e me espelharei sempre no senhor para ser uma pessoa e uma professora melhor.

**Ao Professor Idelmo Rangel Garcia Júnior**, por todo ensinamento dentro e fora dos plantões.

**Ao Professor Leonardo Perez Faverani**, pelos ensinamentos durante as aulas, clínicas de pós-graduação e plantões, o senhor é uma referência para mim!

**Ao Professor Francisley Ávila Souza**, por ter me ajudado desde quando entrei na pós-graduação, cedendo também todo seu conhecimento durante os seminários e plantões. Obrigada pelas dicas de aulas, devo muito ao senhor.

**À Professora Ana Paula Bassi**, obrigada por todo ensinamento, durante aulas, clínicas e plantões. A senhora é um exemplo de mulher, mãe, ser humano, professora, cientista e cirurgiã para mim, obrigada pelas conversas, por mais que curtas e poucas, elas sempre ficaram marcadas.

**Ao Professor Osvaldo Magro Filho**, pelos ensinamentos em centro cirúrgico.

**À Professora Roberta Okamoto**, pelos ensinamentos em sala de aula e sempre que possível sanar muitas dúvidas durante o meu mestrado e por me receber tão bem no Departamento. A senhora é um grande exemplo para mim. Obrigada também a todo seu grupo de Pesquisa.

**Ao Professor Edilson Ervolino**, pela paciência e ensinamentos. Por toda ajuda para desenvolver este projeto durante os experimentos. Muito obrigada à todo seu grupo de pesquisa! Em especial ao **Luan Toro**.

**Ao Dr. André Fabris e Dra. Sabrina Ferreira**, por todo ensinamento durante os plantões e centro cirúrgico.

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

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

**Aos colegas de pós-graduação de CTBMF**, que estão comigo desde o início desta jornada, Anderson Maykon Souza Santos, Jaqueline Hassumi, Leonardo Alan Delanora, Letícia Palin Pitol, Natália Barbosa de Siqueira e Tiburtino José de Lima Júnior, obrigada pela parceria, pelos bons momentos e também aqueles de estresse que compartilhamos juntos, e pelos momentos nos plantões. Aprendi e aprendo muito com vocês. Obrigada pelas dicas, pelos agradáveis momentos, carinho e apoio durante o mestrado.

**Aos colegas de pós-graduação em Implantodontia**, que estão comigo desde o início desta jornada, Ana Cláudia Ervolino, Karen Rawen, Laís Kawamata e Vinicius Bizelli, obrigada pelos bons momentos compartilhados em aula, e pelas trocas de conhecimento.

**Aos colegas do plantão**, muito obrigada pela companhia de vocês durante os dias mais corridos do mês, obrigada pela troca de conhecimento, eu aprendi muito com vocês.

#### **Aos amigos da Pós-Graduação:**

**Leonardo Alan Delanora**, começar sem ser por você seria injusto, pois esta amizade iniciou antes mesmo da pós-graduação. Obrigado por ser esta minha dupla na clínica da pós e por compartilharmos muito conhecimento e cirurgias. Obrigada pela parceria, e por todos os bons momentos que compartilhamos juntos, que foram incontáveis! Teve festa, caminhada, coisas aleatórias, muita cantoria, choro, momentos filosofando foi o que não faltou, congressos, piscina (por sinal saudades) entre muitas outras coisas. Sempre me recordarei com carinho, e muita risada desse meu “*brother*”. Sem você isso aqui se tornaria muito mais difícil e muito mais pesado.

**Ana Flávia Piquera Santos**, na primeira semana você se apresentou e quando ví, estava compartilhando lágrimas, abraços e sorrisos. Você se tornou muito mais que uma amiga, sorte de quem tem uma “Flavinha” em suas vidas! Personificação da bondade. Obrigada por tudo, pela irmandade nos bons e maus momentos, por “segurar muitas vezes as pontas” para mim, por me ajudar no meu pós-operatório, por me ensinar muito sobre este meio científico. Simplesmente obrigada! Eu te amo muito e tenho um imenso orgulho de você e de suas conquistas!

**Vinicius Bizelli**, Biniziu vulgo “fagé”, nem sei quando esta amizade começou, mas sei que nunca irá terminar. Obrigada por tudo! Por ser amigo, leal, confidente, verdadeiro. Obrigada pela parceria, e por me inspirar a ser uma pessoa melhor. Você é a junção de tudo aquilo que mais admiro em um ser humano, e aquilo que almejo ser. Bom filho, irmão, amigo, namorado, estudioso, extremamente trabalhador, sem nunca deixar de sentir o gostinho da vida, e sem nunca perder esse sorriso e brilho nos olhos. Simplesmente Obrigada! Que nossa amizade atravesse décadas! Tenho muita sorte em ser sua amiga, me orgulho e estou sempre torcendo por você!

Vocês três se tornaram - *família* - obrigada por tornarem os dias mais leves, eu amo vocês.

**Natália Barbosa de Siqueira**, obrigada pelos momentos compartilhados, e pela convivência diária por todos esses dois anos morando juntas. Aprendi muito com você, levarei essas lembranças para sempre.

**Anderson Maykon Souza Santos**, obrigada pela parceria e companheirismo. Obrigada por sempre me acudir com prontidão quando necessário, e por sempre manter as portas abertas para mim.

**Tiburtino José de Lima Neto**, vulgo Tibu, ou Tibis, você foi o maior presente que esta pós-graduação poderia me dar. Obrigada por ser uma referência de generosidade e determinação. Obrigada por sempre me fazer acreditar que eu poderia chegar até o final, me incentivando, vibrando e falando para eu ensaiar mais uma vez. Obrigada por me enxergar como a força, através de seus olhos comecei a ter muito orgulho de mim mesma. Obrigada pelo carinho, paciência e conselhos durante as mil e uma conversas e desabafos que tivemos sentados no banquinho do condomínio, momentos estes que se tornaram rotina em um tão curto período de tempo. As 12 horas corridas trabalhando e estudando na faculdade, vivendo nossas responsabilidades se tornaram mais fáceis por saber que no fim do dia iria lhe encontrar em nosso banco. Obrigada por manter a sua porta literalmente sempre aberta para mim. Simplesmente obrigada por tudo.

**Bárbara Rios**, pela sua amizade e ajuda no meu pós operatório. Neste tão curto período de tempo, compartilhamos muitas alegrias, algumas tristezas e alguns cafés..

ou seriam vinhos. Espero que ainda possamos disfrutar de alguns bons plantões e com certeza bons momentos juntas.

**Cecília Sousa**, melhor vizinha que eu poderia ter, obrigada por me acolher sempre tão bem, obrigada pela amizade, conselhos e sempre estar à meu lado. Você é um grande exemplo para mim. Extendo aqui meus agradecimentos à **Duda** por todo lambeijo que recebi.

**Cristiane Cantiga**, pela amizade desde Manaus. Obrigada pela força, apoio, ajuda, carinho durante o meu mestrado e vida. Se não fosse por você eu jamais estaria aqui. Você me deu forças, acreditou em mim e me incentivou. Serei eternamente grata à você. Te amo minha amiga.

**André Oliva**, te agradeço imensamente, pois desde o meu primeiro dia de Araçatuba eu me sentí muito acolhida por você. Obrigada por todas as dicas de comida vegana. Obrigada por tudo o que me ensinastes a nível laboratorial. Obrigada por me ensinar a operar os animais, você foi o responsável por eu aprender tudo isso. Você fará muita falta.

**Raquel Parra da Silva**, é minha amiga, a caminhada foi longa, e termino agradecendo você pois acho que estaria muito longe da linha de chegada sem sua parceria. Obrigada por ter me acolhido tão prontamente em sua linda cidade. Obrigada por todo ensinamento, pelos conselhos, pelo ombro amigo, pelos passeios, pelas viagens, enfim.. por toda sua companhia. Fica até difícil imaginar meus 3 anos de doutorado sem minha dupla de guilhotina e espetinho. Mas eu sei que sempre poderei contar com você. Estendo meu agradecimento aos seus pais, **José e Marli**, pelo carinho e me acolherem sempre tão bem em sua residência.

#### **À toda minha família:**

Agradeço em nome dos meus **queridos avós, Mário** (*in memorium*), por todo apoio, carinho e por sempre acreditar em mim, e à minha avó **Lourdes**, por tanto amor e vibrar sempre por cada conquista minha. Obrigada vó por sempre me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, e corrê-los junto à mim, sem você metade do que conquistei até hoje não seria possível.

**À meus pais, Sandra e Helso** por serem meus maiores fãs e apoiadores. Obrigada por me ensinarem tudo que hoje sei, vocês são as melhores pessoas do mundo. Obrigada por todo amor e carinho, por me incentivarem e se orgulharem de mim. Eu me orgulho e me inspiro muito em vocês. Mãe, que eu tenha metade do amor e bondade que você. Pai que eu tenha metade do seu dom de lecionar. Obrigada por tudo minha rainha e meu rei.

**À Nina**, se todos tivessem a pureza, fidelidade e inocência que um cachorro tem, o mundo seria muito melhor! Nina obrigada por sempre me receber com amor, mesmo quando passo longos períodos longe. Não existe dia ruim quando você chega em casa e recebe o amor de um quatro patas. Te amo filha

**À meu irmão e melhor amigo Ian**, por todo apoio e amor desde o ventre de nossa mãe. Obrigada por todos os dias me enviar mensagens de carinho, amor, suporte. Você me encoraja muito! Você me faz correr atrás de meus sonhos, e agora através de **meus sobrinhos Ana Cecília, Helsinho e Scarface**, eu sinto ainda mais este amor e vontade de conquistar tudo isso por vocês.

**À minha cunhada do coração Maressa**, que me apoia desde o primeiro ano de faculdade. Fostes e contia sendo uma grande inspiração para mim dentro da ciência. Obrigada por todo apoio cunha! Te amo muito. Estendo meu agradecimento, à seus pais **Ana e Lírio**, à sua tia **Ângela**, à seu irmão **Judá** e cunhada **Alice**, que também são minha família e sempre torceram muito por mim.

**À meu primoirmão José**, por todo apoio desde sempre em minha vida. Obrigada por eu sempre encontrar em seus braços amor, carinho, compreensão e um verdadeiro amigo. Obrigada por me incentivar no Mestrado e em tudo. Eu te amo muito e me orgulho muito de você!

**À meus tios Gustavo e Betha**, por todo apoio desde sempre. Vocês são como pais para mim, sempre me aconselhando, me enchendo de amor e carinho e vibrando cada vitória comigo. Obrigada por tudo, eu amo vocês.

**À minhas tias Ana, Vera e Neuza**, pelo incentivo e estarem sempre presentes.

**À meus primos Marcelo, Juliana, Gustavo, Lulu, Renata, Maurinho, Maurinhozinho e Léo** por sempre se fazerem presentes nas etapas da minha vida e me apoiarem muito durante o mestrado.

**À minha prima Andrea**, obrigada por todo carinho e amor. Por ser o sinônimo de amizade de verdade. Por me apoiar e incentivar sempre em relação à meus estudos e trabalhos e sempre se fazer presente e vibrar por minhas conquistas. Eu tenho muito orgulho de ser sua prima e acima de tudo amiga, pois és um ser humano além do comum, iluminado e incrível. És um verdadeiro anjo na minha vida. Me inspiro muito em você para sempre ser uma pessoa melhor. Obrigada minha ET.

**Aos amigos:**

**Aos amigos da graduação, Daniel, Anik, Aureana, Lean e Kethelle**, por toda parceria mesmo após 7 anos de formados. Sempre ao meu lado, vibrando e me apoiando. Vocês são os melhores amigos da vida.

**Aos amigos da vida José Victor, Susan, Jéssica, Júlia Lins, Juliana, Leonardo Romano, Jhulyanne, Ana Paula, Wellington, Hellen, Mayara, Lis, Isabelle, Davi, Yuliana, Isadora, e Brenda** muito obrigada por tudo. Vocês são os melhores, mesmo distante eu nunca me sinto sozinha. Vocês foram excepcionais durante o meu mestrado, sempre me apoiando e se interessando mesmo sem entender haha.

**Aos amigos da Buco, Raphael e Leonardo**, obrigada por estarem sempre ao meu lado, vocês são a minha família de São Paulo, e a melhor que eu poderia pedir. Obrigado por vibrarem junto à mim, todas minhas conquistas. Eu amo Vocês.

**À Professora Dra Ângela**, obrigada por todo ensinamento durante minha formação como Bucomaxilo. Obrigada por todo carinho, paciência e por ser mais do que uma professora, ser uma amiga, uma mãe. Obrigada por tudo e por torcer muito pelo meu sucesso. És um exemplo de mulher, mãe, ser humano, professora e cirurgiã. Me orgulho muito de ter um dedinho seu em minha formação. Espero um dia ser metade do que és. Muito obrigada!

E como não poderia esquecer, aos Professores que fizeram parte da minha graduação na **Universidade do Norte (UNINORTE)**, agradeço pelos ensinamentos e senso de profissionalismo que me transmitiram, permitindo que eu tivesse condições, e garra

para cursar um Mestrado. Mesmo após quase 7 anos de formada, gostaria de agradecer à todos vocês, especialmente à **Prof. Lúgia Vasconcelos e Neylla Sena**. Obrigada por fazerem parte de minha formação e hoje de minha vida como amigas. Me inspiro muito em vocês como mulheres, mães, pessoas, professoras e cientistas. Não há nada melhor do que ter pessoas lindas ao seu lado que tanto lhe inspiram. Obrigada!

***A objeção, o desvio, a desconfiança alegre, a vontade de troçar são sinais de saúde: tudo o que é absoluto pertence à patologia.***

Friedrich Nietzsche

RIBEIRO, K. H. C. **Efeito tempo-dose-resposta do montelucaste no processo de reparo alveolar em camundongos 129Sv/Ev.** 2021. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## RESUMO

Metabólitos do ácido araquidônico são conhecidos por exercerem importante papel nos processos inflamatórios e no metabolismo do tecido ósseo. No entanto, as ações pontuais, especialmente dos leucotrienos derivados da 5-lipoxigenase (5-LO) sobre o processo de reparo ósseo intramembranoso são pouco exploradas. O presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos tempo-dose-resposta da droga montelucaste (MTK), potente antagonista dos receptores de cisteinil leucotrienos tipo 1 (CisLT1Rs), no curso do reparo alveolar pós-exodontia em camundongos 129Sv/Ev, bem como nos níveis plasmáticos de marcadores ósseos bioquímicos. Para tanto, foram utilizados 70 camundongos machos jovens divididos em quatro grupos, de acordo com o tratamento: C - Grupo Controle (não tratados); CV - Grupo Controle Veículo, 20 µL de solução fisiológica (SF) 0,9%; MTK2 – 2 mg/kg de MTK e MTK4 – 4 mg/kg de MTK. Os animais dos grupos CV, MTK2 e MTK4 foram tratados diariamente por via oral, iniciando 24 horas antes do procedimento cirúrgico, continuando até o final dos períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Ao final dos períodos determinados, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de sangue para análise bioquímica dos níveis de cálcio, fosfato, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) total e fosfatase alcalina (FAL), coleta da maxila direita contendo os alvéolos dentários para serem analisados por meio de microtomografia computadorizada (microCT), e análise histopatológica. Os resultados obtidos foram submetidos à testes estatísticos considerando-se nível de confiança de 5%. Observou-se aumento do BV/TV para os animais tratados com MTK em relação aos grupos C e CV, tanto aos 14 dias quanto aos 21 dias, sendo maior no grupo MTK4 aos 14 dias em relação ao grupo MTK2. Do mesmo modo, os animais tratados com MTK em ambas doses apresentaram aumento significativo de Tb.Th em comparação aos grupos C e CV aos 21 dias. Chamou a atenção valores de BV/TV e Tb.Th significativamente reduzidos no grupo CV em comparação ao C, indicando um efeito negativo da manipulação do animal. Na análise histopatológica observou-se reparo ósseo precoce nos animais MTK2 e MTK4 em todos os períodos avaliados, em comparação aos do grupo C, bem

como atraso no processo de reparo no grupo CV aos 21 dias. Quanto aos marcadores plasmáticos, observou-se aumento do cálcio no grupo MTK4 em relação ao grupo C aos 7 dias, e aos 21 dias também em relação ao grupo MTK2. Já o fosfato mostrou-se significativamente elevado nos períodos de 7 e 21 dias no grupo MTK2 em relação aos demais grupos. FAL e TRAP total não apresentaram níveis plasmáticos significativamente diferentes comparando-se os grupos e períodos. Considerando os resultados obtidos, concluiu-se que o MTK exerceu efeito tempo-dose-dependente, acelerando o processo de reparo ósseo intramembranoso alveolar e interferindo nos níveis plasmáticos de cálcio e fosfato no presente modelo animal.

**Palavras-chave:** Camundongos. Leucotrienos. Inibidores de lipoxigenase. Cirurgia Bucal. Densidade óssea. Biomarcadores.

RIBEIRO, K. H. C. **Time-dose-response effect of Montelukast in the process of alveolar repair in 129Sv / Ev mice.** 2020. 73 f. Master's (Dissertation) – Dental School, São Paulo University, Araçatuba, 2021.

## **ABSTRACT**

Arachidonic acid metabolites are known to play an important role in inflammatory processes and in bone metabolism. However, the role of these products on alveolar bone repair post tooth extraction remains to be explored, especially leukotrienes, derived from 5-lipoxygenase (5-LO). The present study aims to analyze the time-dose-response effects of the drug montelukast (MTK), a potent type 1 leukotriene cystenyl antagonist (CisLT1Rs), in the alveolar repair process after extraction in male 129Sv/Ev mice. For this purpose, 70 young male mice were used, divided into four groups: C - Control Group (no treatment); VC - Vehicle Control Group, treated with 20  $\mu$ L of 0.9% SF; MTK2 - treated with 2mg / Kg of MTK and MTK4 - treated with 4mg / Kg of MTK. The animals of the CV, MTK2 and MTK4 groups were treated daily orally (V.O.), starting 24 hours before the surgical procedure, continuing until the end of the experimental periods of 7, 14 and 21 days postoperatively. At the end of the experimental periods, the animals were euthanized for blood collection for serum markers as calcium, phosphate, tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) and alkaline phosphatase (FAL), and to removal of the right maxilla containing the dental socket to be analyzed under computed microtomography (microCT) and histopathology. The results obtained were subjected to statistical tests considering a confidence level of 5%. Results revealed an increase in BV/TV for MTK vs. C and CV groups, in both 14 and 21 days time points. Of note, this increase was higher in MTK4 than in the MTK2 at 14 days. Considering Tb.Th, both MTK2 e MTK4 groups presented positive effects in the BV/TV and Tb.Th increase when compared to controls groups (C and CV) at 21 days. A decrease in BV/TV and Tb.Th was observed in CV compared to C, as a negative effect of animal manipulation. As observed in H&E sections, both MTK2 and MTK4 experimental groups presented an early bone repair in comparison with C group from 7 to 21 days. CV group presented a slight delayed bone healing compared to C. Levels of calcium was increased in MTK4 in comparison to C and MTK2 at 7 and 21 days. Phosphate was significantly elevated at 7 and 21 days in MTK2 in comparison to the other groups. Despite of beneficial effects on observed on morphological levels on sites of healing (microCT and HE), no significant changes were found for bone

markers of remodeling in blood plasma (FAL and TRAP). Taken together, these results indicate that MTK induced early bone healing post tooth extraction in 129Sv/Ev mice. Thus, the inhibition of CysLT is suggested to exert a positive influence on intramembranous bone repair post tooth extraction.

**Keywords:** Mice. Leukotrienes. Lipoxygenase inhibitors. Oral Surgery. Bone density. Biomarkers.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig.1. Procedimento de exodontia do ICS direito (A) Camundongo da linhagem 129Sv/Ev. (B) Aspecto clínico dos incisivos superiores. (C) Alvéolo pós-exodontia. (D) Dente extraído. (E) Presença da papila dentária no terço apical do dente (seta). 33
- Fig. 2. Fluxo de trabalho executado para coleta do plasma. (A) Representação do tubo cônico heparinizado e após coleta de sangue (B) Centrífuga Hettich MIKOR 220/220R (exemplo ilustrativo do site da Hettichlab). (C) Ciclo de centrifugação (4000 rpm, 4°C, 10 minutos). (D). Separação do plasma após centrifugação, representação da separação dos componentes sanguíneos (plasma, glóbulos brancos, glóbulos vermelhos). (E) Coleta do plasma através de micropipeta. (F) Armazenamento em ultracongelador a -80 °C. 34
- Fig. 3. Fluxo de trabalho executado para escaneamento e análise dos alvéolos. (A) Equipamento de microCT SkyScan 1147v2 (exemplo ilustrativo do site da Bruker). (B) Maxilas imediatamente após o escaneamento. (C) Maxilas durante a conversão em imagem microtomográfica pelo software NRecon (Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica). (D) Exemplo de alimento das maxilas no software DataViwer (Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica) após reconstrução dos alvéolos. (E) Exemplo de determinação do ROI no centro do alvéolo para obtenção de dados quantitativos por meio do software CTan. (F) Imagem tridimensional do alvéolo dental obtida por renderização de volume no software CTvox. 35
- Fig. 4. Reconstrução axial dos alvéolos escaneados em MicroCT aos 7, 14 e 21 dias, dos grupos C, MTK2, MTK4 e CV. 40

- Fig. 5. Análise Microtomográfica quantitativas. Análises referentes aos parâmetros (A) BV/TV% (proporção de osso por tecido total), (B) Tb.Th (espessura em mm de trabéculas ósseas neoformadas) e (C) Tb.Sp (separação em mm entre as trabéculas ósseas neoformadas). (\*) Diferenças estatísticas entre os grupos. Foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). 41
- Fig. 6. Análise histológica do processo de reparo alveolar dos grupos C, MTK2, MTK4 e CV, nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental, onde nota-se: preservação da cortical alveolar (setas pretas); presença de coágulo (Cg); evolução para tecido de granulação (TG) e início de neoformação óssea (seta branca) aos 7 dias; trabéculas ósseas neoformadas (\*) aos 14 e 21 dias nos grupos C, MTK2 e MTK4. Atraso de neoformação óssea no grupo CV. Coloração HE; objetiva de 10x. 43
- Fig. 7. Imagens representativas do aspecto histopatológico dos grupos C, MTK2, MTK4 e CV aos 7, 14 e 21 dias experimentais (HE; aumento original 100x). 44
- Fig. 8. Parâmetros bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo entre os grupos C, MTK2 e MTK4. (A) Cálcio, (B) Fosfato, (C) Atividade da fosfatase alcalina total (FAL), e (D) atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato total (TRAP). (\*) Diferenças estatísticas entre os grupos. Foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma

via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, 45  
sendo considerado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Contingente de animais utilizados organizados de acordo com os grupos e tempos experimentais. 31
- Tabela 2. Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido. 32

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	PORCENTAGEM
°C	GRAUS CÉLSIUS
µg/Kg	MICROGRAMA POR QUILO
5-LO	5-LIPOXIGENASE
5LOKO	5 LIPOXIGENASE KNOCKOUT
A.A.	ÁCIDO ARACDÔNICO
BV/TV	VOLUME ÓSSEO EM RELAÇÃO À QUANTIDADE TOTAL
CEUA	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
COX	CICLOXIGENASE
CisLTs	CISTEINIL LEUCOTRIENOS
D	DIA
DP	DESVIO PADRÃO
LTs	LEUCOTRIENOS
LOX	LIPOXIGENASE
EDTA	ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
HE	HEMATOXILINA e EOSINA
ICS	INCISIVO CENTRAL SUPERIOR
IGF	FATOR DE CRESCIMENTO
IL	INTERLEUCINA
IP	INTRA PERITONEAL
KO	KNOCKOUT
LTB4	LEUCOTRIENO B4
mg/kg	MILIGRAMA POR QUILO
microCT	MICROTOMOGRAFIA
PUFAs	ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS
cPLA 2	FOSFATASE A2 CITOSÓLICA
PGs	PROSTAGLANDINAS
OC	OSTEOCLASTO
LPS	LIPOPOLISSACARÍDEOS
AINEs	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS
FLAP	PROTEÍNA ATIVADORA DA 5-LIPOXIGENASE
P	PROBABILIDADE DE SIGNIFICÂNCIA

PGE2	PROSTAGLANDINA E2 (EICONSANOIDE)
PVPI	POLIVINILPIRROLIDONA
LTA4	LEUCOTRIENO A4
LTC4	LEUCOTRIENO C4
LTD4	LEUCOTRIENO D4
LTE4	LEUCOTRIENO E4
CISLTR1	RECEPTOR-1 DE CISTEINIL LEUCOTRIENO
NFATc1	FATOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ATIVADAS c1
Tb.N	NÚMERO DE TRABÉCULAS
Tb.Sp	SEPARAÇÃO DE TRABÉCULAS
Tb.Th	ESPESSURA DE TRABÉCULAS
TG	TRICOTÔMICO DE GOLDNER
MTK	MONTELUCASTE
TNF	FATOR DE NECROSE TUMORAL
TRAP	FOSFATASE ÁCIDO RESISTENTE AO TARTARATO (POSITIVA)
FAL	FOSFATASE ALCALINA
WT	WILD TYPE
CONCEA	CONSELHO NACIONAL PARA O CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO BRASIL
C	GRUPO CONTROLE
CV	GRUPO CONTROLE VEÍCULO
MTK2	GRUPO MONTELUCASTE 2MG/KG/DIA
MTK4	GRUPO MONTELUCASTE 4MG/KG/DIA
Mg	MILIGRAMAS
Kg	KILO
N	NÚMERO DA AMOSTRA
V.O.	VIA ORAL
µL	MIRCROLITO
SF	SORO FISIOLÓGICO
PVPI	POLIVINILPIRROLIDONA
Rpm	ROTAÇÃO POR MINUTO
kV	KILOVOLTS
p-NPP	P-NITROFENILFOSFATO
p-NP	P-NITROFENIL
Nm	NANÔMETRO

Cm	CENTÍMETROS
U/L	UNIDADES POR LITRO
μCT	MICROTOMOGRFIA
mg/dL	MILIGRAMAS POR DECILITRO
Fig	FIGURA
OVX	OVARIECTOMIA
MT2	METALOTIONEÍNA TIPO 2
SPP1	FOSFOPROTEÍNA 1 SECRETADA
CA <sup>2+</sup>	CÁLCIO

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivos Gerais	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais	31
3.2 Desenho Experimental	32
3.3 Cirurgia e Coleta dos Espécimes	33
3.3.1 Procedimentos Cirúrgicos	33
3.3.2 Coleta dos Espécimes	34
3.4 Micro-CT	35
3.5 Análises Bioquímicas	36
3.5.1 Concentração Plasmática do Cálcio e Fosfato	36
3.5.2 Atividade Total de TRAP e FAL	36
3.6 Procedimentos Histotécnicos	37
3.7 Análise Histopatológica em HE	37
3.8 Métodos Estatísticos e Análise de poder	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Análise microtomográfica	39
4.2 Análise histopatológica	41
4.2.1 Análise histológica descritiva	41
4.3 Resultados de marcadores plasmáticos	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	61
ANEXO A	62
ANEXO B	63

## 1 INTRODUÇÃO\*

A descoberta dos metabólitos gerados a partir do ácido araquidônico (A.A.), tais como os leucotrienos (LTs), permitiu um melhor entendimento da atuação de suas enzimas com relação à resposta inflamatória [1]. A 5-lipoxigenase (5-LO), consiste em uma das principais enzimas da via lipoxigenase (LOX) e sua inibição ou bloqueio impedem a formação de todas as classes de LTs. A partir destas informações, foram realizados estudos utilizando camundongos geneticamente modificados (*knockout*) para 5-LO (5-LOKO) e utilizando drogas que inibem esta via, a fim de permitir um melhor entendimento sobre seu papel em diferentes doenças inflamatórias das vias aéreas superiores como a asma [2], bem como doenças de caráter osteolítico como a artrite reumatóide [3,4] e a periodontite [5]. No entanto, a relação entre estas enzimas e o processo de reparo ósseo ainda carece de esclarecimentos.

O osso é um tecido dinâmico, cuja matriz mineralizada é mantida pela atividade coordenada de células ósseas especializadas tais como, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos [6,7,8,9]. O osso alveolar, possui alta atividade de remodelação, em resposta às demandas do sistema estomatognático [10] e apesar de sua origem embriológica diferente, é biologicamente e estruturalmente comparável aos demais ossos do corpo. A remodelação óssea consiste em processo de equilíbrio entre reabsorção e a neoformação óssea, sem que haja alterações funcionais [6,11,12]. Sendo assim, a homeostasia e a capacidade de reparo do tecido ósseo dependem do balanço dinâmico entre estes dois eventos, assim como depende da ação de diversos fatores locais e sistêmicos, incluindo hormônios (como a vitamina D3, estrógeno e paratormônio), citocinas e fatores de crescimento [13,14]. Dessa forma, um desequilíbrio nesse processo pode resultar doenças ósseas, havendo assim perda ou ganho de massa óssea em níveis não fisiológicos [15,16,17].

Após a exodontia, o alvéolo dental é preenchido por coágulo sanguíneo, e ocorre então a migração de células de inflamação, especialmente leucócitos, desencadeando uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios, dentre eles, metabólitos do A.A. Em seguida, ocorrem as fases proliferativa, de diferenciação e deposição de matriz óssea, e por fim, a fase de maturação óssea [18].

---

\* Formatado de acordo com as normas da revista Bone (<https://www.journals.elsevier.com/bone>)

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*, representam tipos de lipídios esterificados nos fosfolipídios nas membranas celulares dentre os quais destaca-se o A.A., cujos metabólitos, denominados eicosanoides, atuam como potentes mediadores nos processos inflamatórios e na resposta imunológica [19]. A fim de gerar os eicosanoides, os A.A. precisam ser liberados das membranas pela ação da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), e posteriormente serem metabolizados por meio de rotas oxidativas enzimáticas via cicloxigenase (COX) e 5-LO gerando os chamados prostanóides e LTs, respectivamente [20]. No grupo dos prostanóides encontram-se as prostaglandinas (PGs), tromboxanos e prostaciclina [21], responsáveis pelos efeitos de dor, febre, eventos vasculares e pela regulação da migração e ativação de células do sistema imunológico. Já os LTs controlam a permeabilidade vascular, a contração da musculatura lisa e a ativação das células do sistema imunológico [22]. No entanto, apesar dos tradicionais efeitos dos eicosanoides nas condições inflamatórias e imunológicas, os mesmos também exercem importante influência sobre o metabolismo do tecido ósseo dependendo da isoforma enzimática predominante [23].

Vários estudos têm se concentrado nas enzimas envolvidas no metabolismo do A.A., seus metabólitos e nos receptores de seus metabólitos no processo de reabsorção óssea desencadeada pela inflamação. Denomina-se COX-1 a enzima constitutivamente presente nos tecidos, a partir da qual são gerados os prostanóides necessários para a homeostasia tecidual. No entanto, no ano de 1989, uma isoforma induzível de COX foi identificada [24] e denominada COX-2, a qual é ativada por diferentes estímulos, predominantemente inflamatórios, como lipopolissacarídeos (LPS), interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), entre outros, e tem importante papel na osteoblastogênese e reparo ósseo [11,19, 25,26].

Evidências sobre os efeitos da COX-2 no tecido ósseo tomaram maior destaque quando do advento dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) específicos para inibição da COX-2, os chamados coxibs, como por exemplo o celecoxibe, etorocoxibe, rofecoxibe. A partir de inúmeros trabalhos, constatou-se a relação da COX-2 e a sua importância para a osteoblastogênese e reparo ósseo, uma vez que a administração prolongada dos coxibs interferiam negativamente nos processos de reparação óssea [27,28].

De modo contrário, os metabólitos gerados a partir da 5-LO também exercem efeitos no processo de remodelação óssea, sendo responsáveis pela osteoclastogênese. O A.A. é metabolizado pela 5-LO a partir de sua interação com uma proteína de membrana nuclear, denominada Proteína Ativadora da 5-Lipoxigenase (FLAP). Sendo assim, a 5-LO resulta na formação do leucotrieno A4 (LTA4), sendo convertido em LTB4 por uma reação enzimática mediada pela hidrolase LTA4. Quando conjugada com glutationa por LTC4, formam os cisteinil leucotrienos (CisLTs), LTC4, LTD4 e LTE4 respectivamente [26,29,30,31]. Estas alterações ocorrem, possivelmente, pela participação dos LTs nos vários estágios de formação, desenvolvimento e ativação destas células [22,24]. Além disso, uma das funções do receptor-1 de CisLT (CisLTR1) é a indução do sinal de  $Ca^{2+}$  intracelular [24]. No início da osteoclastogênese, o RANKL aumenta a concentração de  $Ca^{2+}$  no interior das células precursoras dos osteoclastos, ativando o fator nuclear de ativação das células T/C1 (NFATc1), principal fator de transcrição dos genes osteoclásticos, pela fosfatase calcineurina e deste modo, regulando a formação dos osteoclastos via sinalização deste íon [32,33].

Deste modo, a COX-2 e a 5-LO exercem efeitos opostos. Os mecanismos pelos quais os LTs atuam sobre a remodelação óssea começaram a ser investigados por meio de estudos *in vitro* que demonstraram que os LTs estimulam osteoclastos e consequente reabsorção óssea [34]. Posteriormente, evidências apoiadas em estudos *in vivo*, revelam que a ausência de atividade da 5-LO pode causar alterações ósseas morfológicas importantes como aumento da espessura da porção cortical associada à diminuição no número e atividade das células osteoclásticas [19,26,27,29]. Quanto ao reparo ósseo, há evidências de que a ablação genética da 5-LO acelera significativamente a consolidação de fraturas de ossos longos em modelos animais [19,26,27,29], uma vez que a perda da atividade de 5-LO resulta em uma fase condróide mais pronunciada e uma transição mais rápida para a formação óssea em modelos de roedores [29,30]. De fato, em um estudo anterior do nosso grupo, foi demonstrado que camundongos 5-LOKO, apresentam capacidade de cura músculo-esquelética melhorada durante o envelhecimento, quando comparadas aos selvagens ou WT (do inglês *Wild Type*) [35].

A partir destas informações, estudos a respeito da inibição da 5-LO tem sido desenvolvidos a fim de se investigar seu papel sobre a ação osteoclástica e conseqüentemente reabsortiva, em condições onde a formação óssea se faz necessária, como por exemplo, no reparo de fraturas ósseas, e pós-exodontia. No entanto, a condição KO ocorre desde o desenvolvimento do animal, e pode interagir com outras regiões do genoma que se relacionam com esta via em animais 5-LOKO, como a downregulação de metalotioneína tipo 2 (*MT2*) e fosfoproteína 1 secretada (*SPP1*), genes importantes para o metabolismo ósseo [36]. Sendo assim, este modelo animal é de grande valia para entender inicialmente o efeito do bloqueio do gene desta enzima, enquanto que, o uso de fármacos específicos para inibir a via 5-LO, como o Zileuton® [37,38], ou antagonistas dos receptores para CisLTs, como o Pranlucaste® [39] e Montelukaste®, em animais WT, podem ser uma estratégia efetiva no sentido de estudar seu papel pontual diante de uma condição [30]. O MTK, é um antagonista do CisLTR1 altamente seletivo e está no mercado para o tratamento de manutenção da asma, mediada por CisLTs, além de rinite alérgica e urticária de longa duração [40,41].

Embora existam evidências do papel destes medicamentos na remodelação óssea [30], e do seu efeito positivo no reparo ósseo de ossos longos em roedores [30,32], o efeito destes fármacos comercialmente disponíveis não foi ainda testado em modelos de reparo de ossos intramembranosos. Sendo assim, uma vez que os CisLTs tem sido descritos como mediadores da osteoclastogênese, além do seu papel inflamatório [20,24], torna-se oportuna sua investigação sobre o reparo ósseo alveolar pós-exodontia, por tratar-se de condição de interesse para otimização dos procedimentos de reabilitação e restabelecimento das funções do sistema estomatognático. Deste modo, propõe-se com o presente estudo analisar o efeito tempo-dose-resposta do MTK durante o processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos 129Sv/Ev machos, além de analisar seu efeito nos níveis plasmáticos para os marcadores ósseos de cálcio, fosfato, TRAP total e FAL.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

O presente estudo tem por objetivo avaliar o papel do tempo-dose-resposta do MTK ao longo do processo de reparo alveolar pós-exodontia em camundongos 129Sv/Ev machos jovens.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Analisar o efeito tempo-dose-resposta do MTK (2 mg/kg e 4 mg/kg) sobre o padrão morfológico e quantitativo de reparo alveolar de incisivos superiores recém-extraídos, por meio de avaliação microtomográfica, histológica, bem como sobre os níveis plasmáticos de cálcio, fosfato, TRAP total e FAL.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para este estudo, 70 camundongos jovens machos 129Sv/Ev foram obtidos do Biotério Central para Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Brasil (CCCE-FMRP-USP), e alojados no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA /UNESP), sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo no #00464-2019 (ANEXO). Os animais foram divididos em 4 grupos distintos e analisados em três períodos experimentais, conforme a Tabela 1. Os animais apresentavam idade média de 12 semanas e peso médio de 28 gramas. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), umidade relativa de 40-70% e ciclo claro escuro 12/12 horas. A dieta padrão (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.®, São Paulo, Brasil) e água foram fornecidas *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia em que a alimentação foi triturada. Todos os procedimentos seguiram as normativas do CONCEA (Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal no Brasil), do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health (Institute of Laboratory Animal Resources (EUA)*, bem como do Recomendações das diretrizes ARRIVE [42].

Períodos	Grupos				n total do período
	C	MTK2	MTKK4	CV	
7 dias	7	7	7	0	21
14 dias	7	7	7	0	21
21 dias	7	7	7	7	29
Total	21	21	21	7	70

**Tabela 1.** Contingente de animais utilizados organizados de acordo com os grupos e tempos experimentais.

### 3.2 Desenho Experimental

Os animais foram distribuídos em quatro grupos distintos de acordo com o tratamento (Tabela 2): Controle (C): controle negativo, sem tratamento; (CV): controle veículo, soro fisiológico (SF) 0,9% estéril, MTK2: 2 mg/kg/dia de MTK (CAS no 151767-02-1 Cayman Chemicals®, Michigan-EUA) e MTK4: 4mg/Kg/dia de MTK. O MTK foi diluído em SF 0,9% estéril e administrado por via oral (V.O.). Os camundongos do grupo MTK2 receberam um volume de 10 µL da solução e os do grupo CV e MTK4 receberam um volume de 20 uL da solução, a cada 24 horas, durante todos os períodos experimentais. Os grupos foram distribuídos e analisados em três períodos experimentais: 7, 14 e 21 dias após o procedimento de exodontia, com um total de sete animais por grupo/período, exceto para o grupo CV, que foi analisado apenas para período de 21 dias, afim de se observar possíveis alterações devido à manipulação do animal. O tamanho da mostra *a priori* e o cálculo amostral foram determinados com a ferramenta *on line* (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power>), disponibilizada por Lenth 2009 [43]. Os parâmetros calculados para o tamanho da amostra incluíram o poder ( $1 - \beta$ ) de 0,95 e erro- $\alpha$  de 0,05 em um modelo experimental de comparação de médias entre os grupos, com um número mínimo de 7 animais por grupo. De acordo com o cálculo de poder, a inclusão de sete animais por grupo / ponto no tempo foi determinada como suficiente para detectar uma diferença estatisticamente significativa de 15% do volume ósseo entre as amostras com um poder de 80% a um nível de significância de 5%. Esses números também foram determinados com base em estudos anteriores de nosso grupo [35].

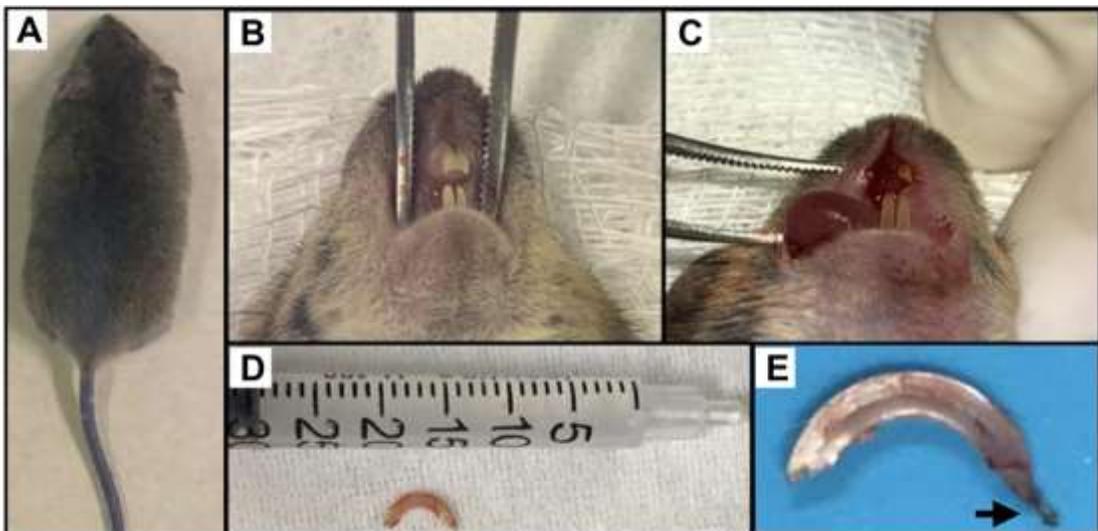
Identificação do grupos	<i>n</i>	Tratamento
C	21	Sem tratamento.
MTK 2	21	2 mg/kg de MTK diluído em 10 µL de sf 0,9% V.O. a cada 24 horas iniciando 24h antes do procedimento cirúrgico.
MTK4	21	4 mg/kg de MTK diluído em 20 µL de sf 0,9% V.O. a cada 24 horas iniciando 24 h antes do procedimento cirúrgico.
CV	7	20 µL de soro fisiológico 0,9% V.O. a cada 24 horas iniciando 24 h antes do procedimento cirúrgico.

**Tabela 2.** Apresentação dos grupos de acordo com o tratamento recebido.

### 3.3 Cirurgia e Coleta dos Espécimes

#### 3.3.1 Procedimentos Cirúrgicos

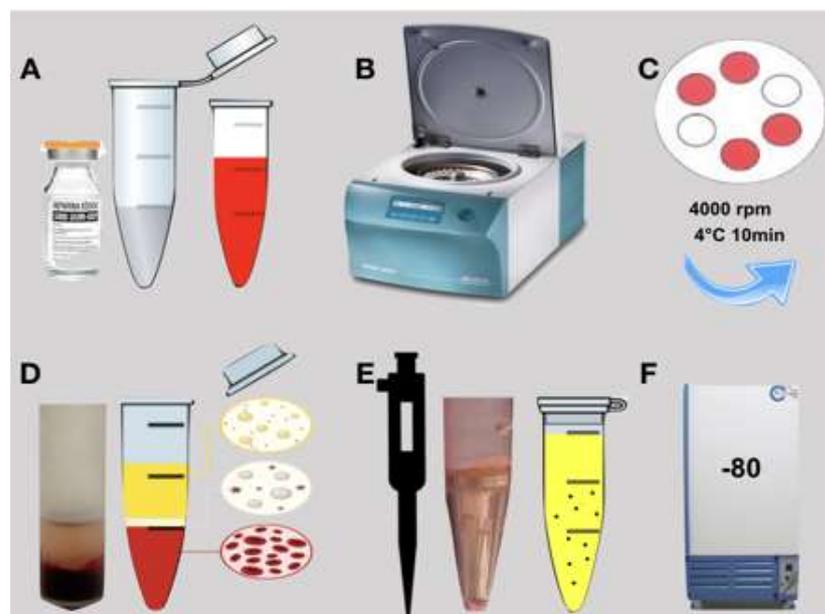
Para a realização da exodontia do incisivo superior direito, os animais foram submetidos à sedação profunda administrada via intraperitoneal (IP), utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina (75 mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Procedeu-se a antissepsia da cavidade bucal com polivinilpirrolidona 1% tópica (PVPI) (Dermoidine® - Gessy Lever Industrial Ltda.), montagem dos campos cirúrgicos estéreis e o incisivo extraído seguindo a técnica de exodontia em camundongos [44]. Foi realizada uma incisão sulcular ao redor do dente incisivo superior (ICS) direito com lâmina de bisturi para pequenos roedores. Em seguida realizada divulsão da mucosa inserida e luxação com auxílio de uma sonda exploradora nº 5 adaptada, e uma pinça para pequenos roedores para a apreensão e extração propriamente dita do dente. Após a exodontia, analisou-se o dente extraído para confirmação da presença da papila dentária (Fig. 1), por meio de microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) nos aumentos de 16x e 25x.



**Figura 1.** Procedimento de exodontia do ICS direito **(A)** Camundongo da linhagem 129Sv/Ev. **(B)** Aspecto clínico dos incisivos superiores. **(C)** Alvéolo pós-exodontia. **(D)** Dente extraído. **(E)** Presença da papila dentária no terço apical do dente (seta).

### 3.3.2 Coleta dos Espécimes

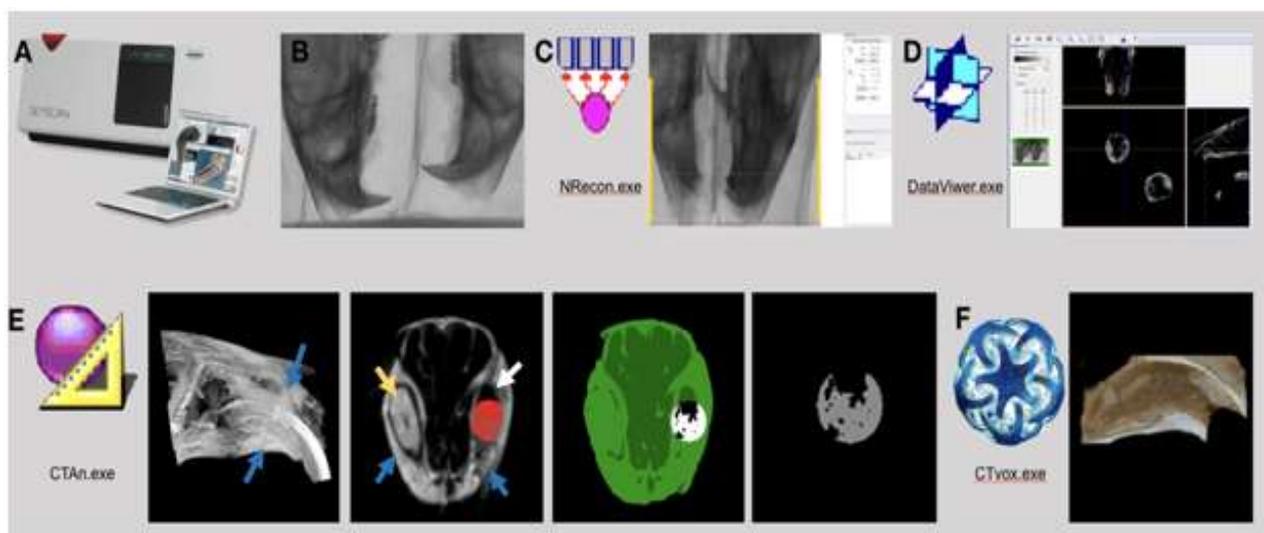
Sete animais por grupo foram selecionados aleatoriamente, após 7, 14 e 21 dias das exodontias, e submetidos à sedação profunda administrada por via IP, utilizando uma combinação do sedativo cloridrato de quetamina (80 mg / kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (15 mg / kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA), e sendo sacrificados por decaptação por meio de guilhotina para coleta de sangue em microtubos de centrifugação de 2,0 mL para obtenção de plasma por centrifugação (4000 rpm , 4°C, 10 minutos) (Hettich® MIKRO 220/220R centrifuge, Tuttlingen, Germany). O plasma coletado foi armazenado a -80°C até o momento das análises bioquímicas (Fig.2). Posteriormente, as amostras de maxila contendo os alvéolos direitos foram coletadas com o emprego de uma lâmina n° 20 acoplada ao cabo de bisturi [45], e imediatamente imersas em formol tamponado a 10% e armazenadas em temperatura ambiente por 48 horas. Após esse período, foram lavadas em água corrente por 24 horas, acondicionadas em etanol hidratado 70° e encaminhadas para obtenção das imagens em MicroCT, antes de serem desmineralizadas e processadas para as análises histológicas.



**Figura 2.** Fluxo de trabalho executado para coleta do plasma. **(A)** Representação do tubo cônico heparinizado e após coleta de sangue **(B)** Centrífuga Hettich MIKOR 220/220R (exemplo ilustrativo do site da Hettichlab). **(C)** Ciclo de centrifugação (4000rpm, 4°C, 10 minutos). **(D)**. Separação do plasma após centrifugação, representação da separação dos componentes sanguíneos (plasma, glóbulos brancos, glóbulos vermelhos). **(E)** Coleta do plasma através de micropipeta. **(F)** Armazenamento em ultracongelador a -80 °C.

### 3.4 Micro-CT

As maxilas contendo os alvéolos direitos foram digitalizadas em microCT( $\mu$ CT) da marca Skyscan, modelo 1174 System (Kontich, Bélgica), com um tempo de aquisição de 33 minutos, a 50 kV, 800  $\mu$ A, com filtro de alumínio de 0,5 mm, 180 graus de rotação e faixa de exposição de 1 grau, sendo as imagens capturadas com uma resolução de resolução de 1304 x 1024 pixels, com um tamanho de voxel de 14 $\mu$ m. Posteriormente, as imagens obtidas foram reconstruídas no software Nrecon (Skyscan), realinhadas no software DataViewer no sentido axial, para posterior análise quantitativa e qualitativa do tecido ósseo neoformado, e analisadas no software CTAnalyzer (SkyScan), para a quantificação de diferentes parâmetros trabeculares (Fig. 3). Posteriormente, as imagens foram reconstruídas em 3D por meio do software CTvox. Os seguintes parâmetros foram analisados: fração de volume ósseo (BV / TV,%), espessura trabecular (Tb.Th, mm) e separação trabecular (Tb.Sp, mm). As regiões de interesse (ROIs) foram definidas com base na literatura, englobando os três terços dos alvéolos [46,47].



**Figura 3.** Fluxo de trabalho executado para escaneamento e análise dos alvéolos. **(A)** Equipamento de microCT SkyScan 1147v2 (exemplo ilustrativo do site da Bruker). **(B)** Maxilas imediatamente após o escaneamento. **(C)** Maxilas durante a conversão em imagem microtomográfica pelo software NRecon (Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica). **(D)** Exemplo de alimento das maxilas no software DataViwer (Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica) após reconstrução dos alvéolos. **(E)** Exemplo de determinação do ROI (círculo vermelho) no centro do alvéolo para obtenção de dados quantitativos por meio do software CTAn.Osso alveolar (seta azul), dente intacto, lado controle (seta amarela), alvéolo pós-extração (seta branca). **(F)** Imagem tridimensional do alvéolo dental obtida por renderização de volume no software CTvox.

## 3.5 Análises Bioquímicas

### 3.5.1 Concentração Plasmática do Cálcio e Fosfato

A concentração de cálcio plasmática foi determinada pelo método Arsenazo III, enquanto o fosfato inorgânico plasmático foi analisado pelo método do molibdato de amônio, ambos utilizando um kit comercial adquirido na Bioclin® (Belo Horizonte, MG, Brasil) de acordo com métodos previamente descritos [48,49].

### 3.5.2 Atividade Total de TRAP e FAL

A atividade TRAP foi medida por hidrólise de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) a *p*-nitrofenil (*p*-NP) em pH 5,8, na presença de tartarato de sódio e *p*-hidroximercurio benzoato [50,51], este último atua inibindo as fosfatases ácidas de baixa massa molecular [52]. A atividade da FAL foi medida com base na capacidade dessa enzima em catalisar a hidrólise de *p*-NPP a *p*-NP em pH 9,4, na presença de cloreto de magnésio [53]. Em ambas as determinações, a formação de *p*-NP foi determinada espectrofotometricamente por meio da leitura da absorbância a 405 nm, usando um coeficiente de extinção molar de  $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Controles sem enzima foram incluídos com cada ensaio para ajustar a hidrólise não enzimática de *p*-NPP. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar  $1 \mu\text{mol}$  de *p*-NPP por minuto a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . As atividades TRAP e FAL foram expressas em U/L.

### **3.6 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 20 dias aproximadamente, até não apresentarem resistência ao corte com navalha. Posteriormente, as amostras foram novamente lavadas em água corrente por 12 horas e submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (Darmstadt, Alemanha). Para a inclusão, procedeu-se a desidratação dos espécimes em banhos de solução de etanol. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol, e por fim incluídas em parafina para confecção dos blocos. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido transversal (perpendicular ao longo eixo do alvéolo dental), utilizando-se micrótomo Leica Jung RM 2045. Foram obtidos cortes semi-seriados de 4 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE).

### **3.7 Análise histopatológica em HE**

A análise histológica qualitativa foi realizada com emprego de um microscópio óptico binocular na região de terço médio do alvéolo dental, dos diferentes períodos experimentais (7, 14 21 dias) para todos os grupos (C, CV, MTK2 e MTK4), considerando-se os seguintes parâmetros: presença de coágulo e tecido de granulação, padrão do infiltrado inflamatório, neoformação, maturação e remodelação do tecido ósseo neoformado.

### **3.8 Métodos Estatísticos e Análise de poder**

Os dados quantitativos foram inicialmente analisados quanto a distribuição de normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk. Os dados dentro da distribuição de normalidade foram posteriormente avaliados por meio do teste One Way ANOVA

seguido de Tukey. Dados fora da distribuição foram analisados pelo teste Kruskal Wallis seguido de Dunn.

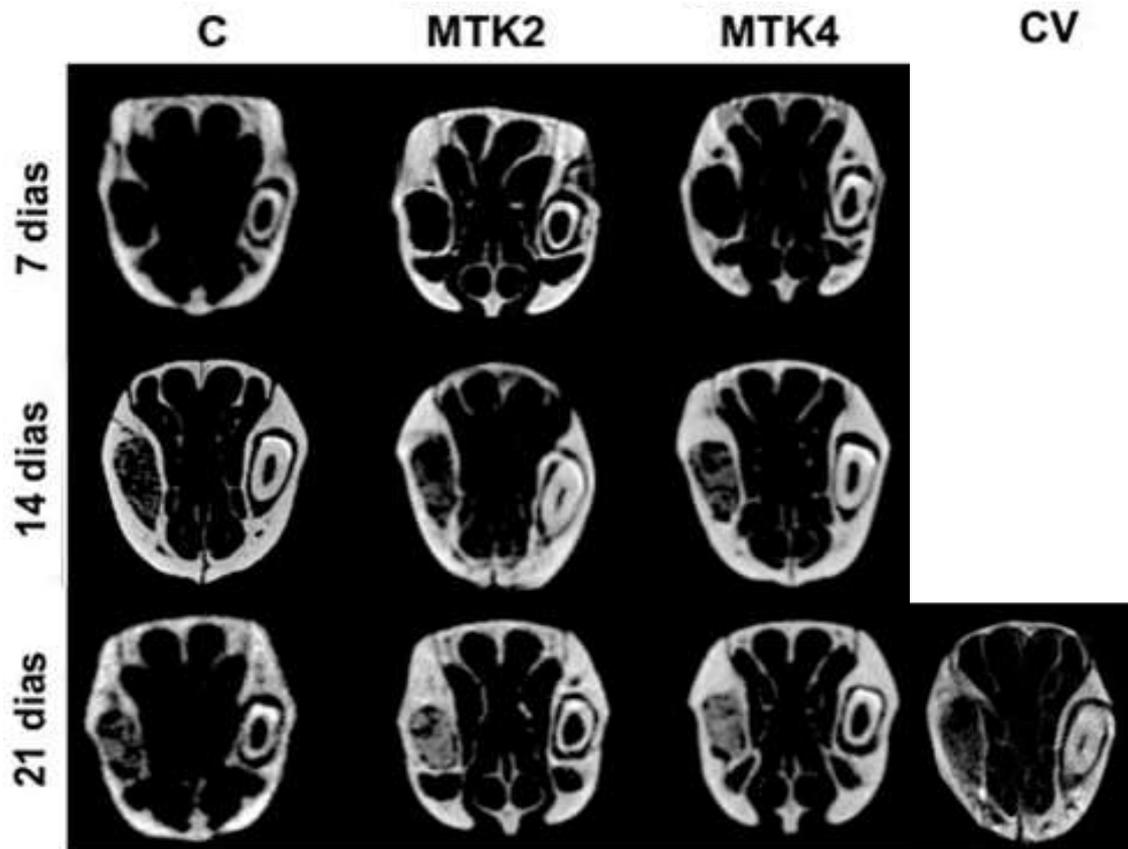
Todos os testes estatísticos serão avaliados a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e serão aplicados por meio dos programas GraphPadInStat e Prism5 (GraphPad, San Diego, CA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise microtomográfica

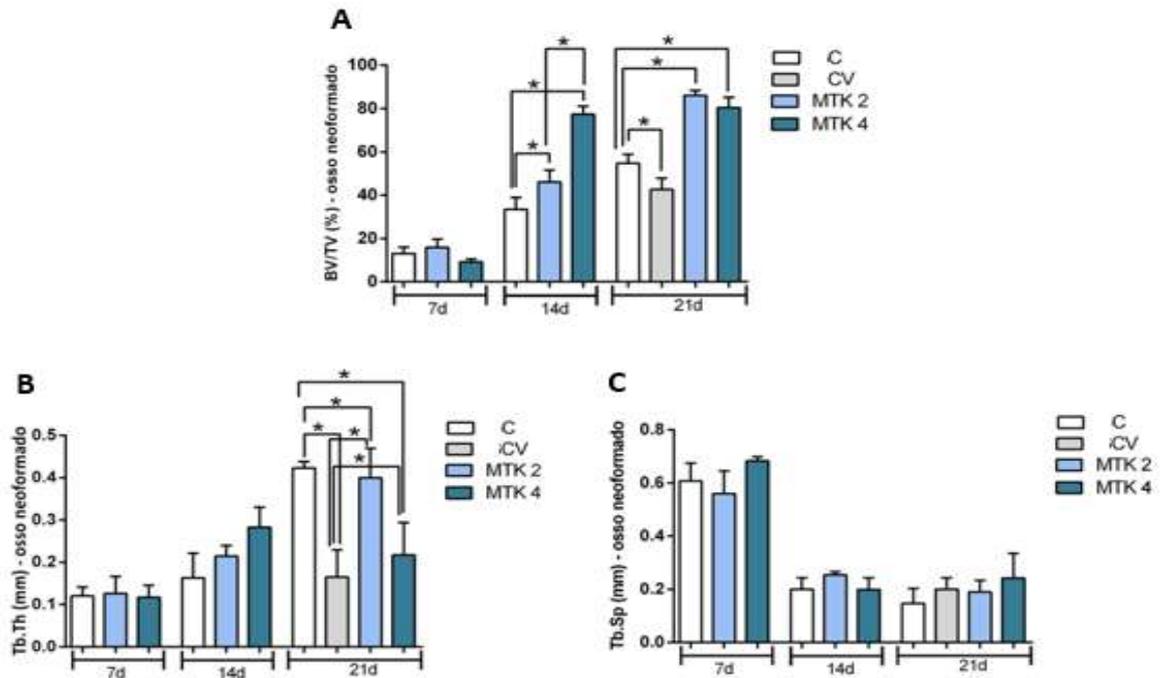
A microCT permitiu uma análise descritiva (quantitativa) por meio de reconstrução tridimensional (3D) do reparo ósseo dos alvéolos direitos, durante os três períodos experimentais analisados (7, 14 e 21). As maxilas foram submetidas à escaneamento em microCT, reconstruídas (utilizando os *softwares* NRecon e DataViewer). Para melhor representar a evolução do reparo nas regiões mais centrais do alvéolo, utilizou-se o plano de secção transaxial, na altura do terço médio do alvéolo. Dentro de uma escala de densidade tomográfica, as estruturas hiperdensas representam o tecido ósseo maduro das estruturas ao redor do alvéolo, servindo como parâmetro de comparação com a densidade tomográfica observada na área do alvéolo dental ao longo dos diferentes períodos (Fig. 4). Em seguida analisadas por meio do *software* CTAnalyzer (SkyScan), para determinação do volume ósseo neoformado em relação a quantidade total de tecido (BV/TV), bem como para parâmetros morfológicos como espessura (Tb.Th, mm) e separação de trabéculas (Tb.Sp, mm) (Fig.5).

Os resultados microtomográficos qualitativos observados na Figura 4 demonstram uma baixa hiperdensidade no interior dos alvéolos de todos os grupos, no período de 7 dias, uma vez que este corresponde ao início da mineralização da nova matriz óssea sendo depositada. Já nos períodos de 14 e 21 dias, áreas hiperdensas são visíveis em todos os grupos. No que diz respeito ao grupo C, a evolução do reparo ósseo encontra-se de acordo com o já observado em outros estudos utilizando reparo alveolar do incisivo superior direito em camundongos [28], sendo observada uma maior hiperdensidade do grupo C aos 21 dias em comparação com o grupo CV. Importante notar que os grupos MTK2 e MTK4 apresentaram maior hiperdensidade comparados aos grupos C e especialmente CV aos 21 dias.



**Figura 4.** Reconstrução axial dos alvéolos escaneados em MicroCT aos 7, 14 e 21 dias, dos grupos C, MTK2, MTK4 e CV.

Os resultados qualitativos foram coerentes com os resultados observados na análise quantitativa. Por meio da análise quantitativa, graficamente representada na Figura 5, observa-se que os grupos MTK2 e MTK4 revelaram maior BV/TV (%) aos 14 ( $46,00 \pm 5,60$  /  $77,40 \pm 3,90$ ) e 21 ( $86,15 \pm 2,24$  /  $80,46 \pm 4,77$ ) dias comparados aos grupos C ( $33,50 \pm 5,50$  /  $54,83 \pm 4,02$ ) e CV ( $42,6 \pm 5,27$ ), sendo que o grupo MTK4 ( $77,40 \pm 3,90$ ) apresentou valores maiores em relação ao grupo MTK2 ( $46,00 \pm 5,60$ ) para os 14 dias. Nota-se que aos 21 dias, o grupo CV ( $42,6 \pm 5,27$ ) apresentou menor BV/TV em relação ao C ( $54,83 \pm 4,02$ ), indicando um efeito negativo da manipulação do animal sobre o reparo (Fig. 5A). Em relação aos parâmetros morfológicos indicativos da qualidade trabecular, observa-se que ambos MTK2 ( $0,4 \pm 0,07$ ) e MTK4 ( $0,22 \pm 0,07$ ) tiveram efeitos positivos em aumentar a espessura das trabéculas (Tb.Th) em comparação ao C ( $0,42 \pm 0,01$ ) e CV ( $0,16 \pm 0,064$ ) aos 21 dias (Fig. 5B). Os resultados não revelaram diferença estatística da separação das trabéculas (Tb.Sp) (Fig. 5C) entre os grupos e períodos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5. Análise Microtomográfica quantitativas.** Análises referentes aos parâmetros (A) BV/TV% (proporção de osso por tecido total), (B) Tb.Th (espessura em mm de trabéculas ósseas neoformadas) e (C) Tb.Sp (separação em mm entre as trabéculas ósseas neoformadas). Os gráficos apresentam valores da média e desvio padrão, e as diferenças estatísticas são apresentadas pelo símbolo \*. Foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Análise Histopatológica

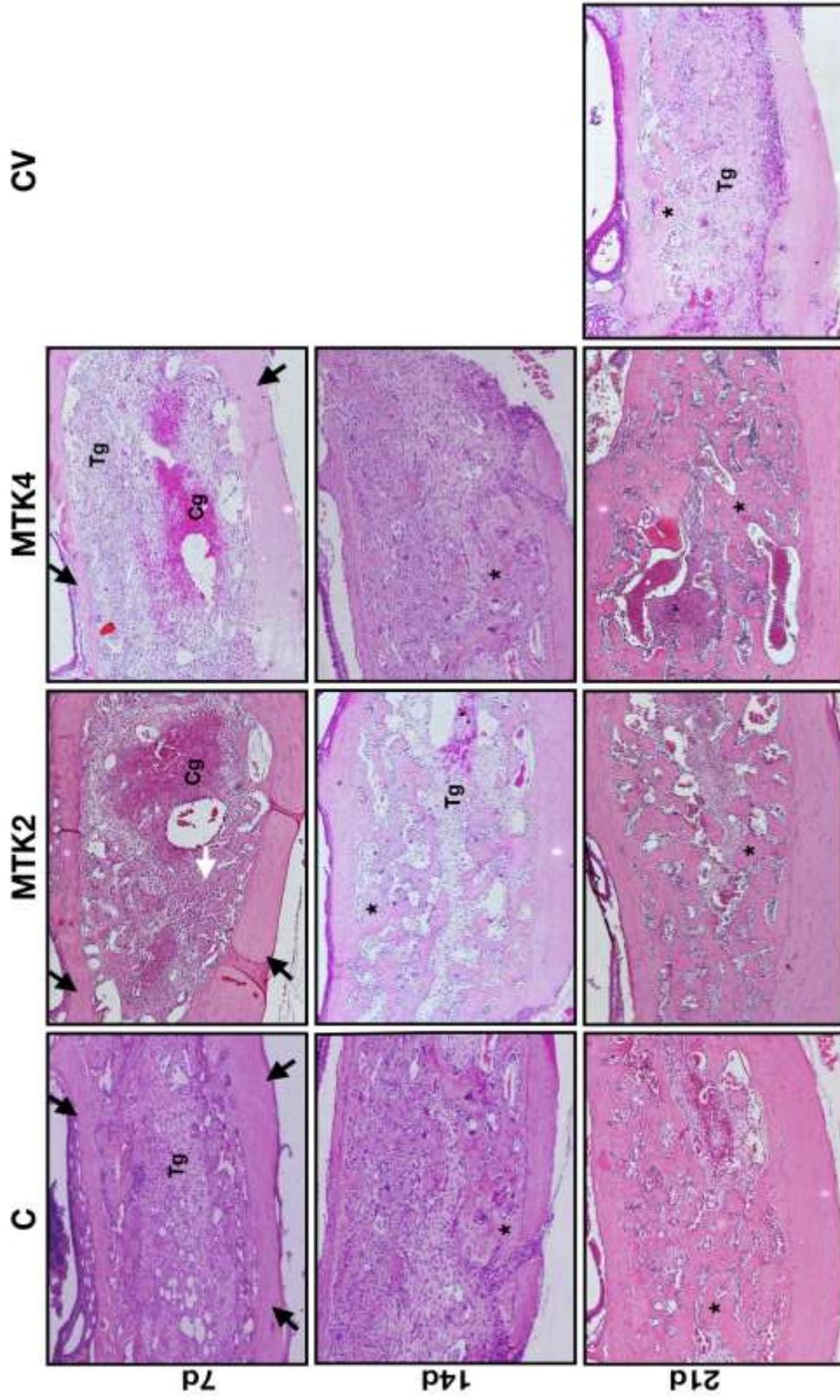
### 4.2.1 Análise Histológica Descritiva

Realizou-se inicialmente a descrição histológica qualitativa do reparo ósseo alveolar em cortes histológicos do alvéolo dental dos camundongos do grupo C, sendo estes dados utilizados como um controle em comparação do reparo ósseo alveolar dos camundongos CV, MTK2 e MTK4. Primeiramente, as amostras foram representadas em uma visão panorâmica do terço médio do alvéolo dental (Fig.6) registradas em objetiva de 10x, mostrando assim a cinética do processo de reparo alveolar. Em seguida, as amostras foram analisadas em corte transversal do terço médio do alvéolo e visualizadas em objetiva de 100x (Fig. 7).

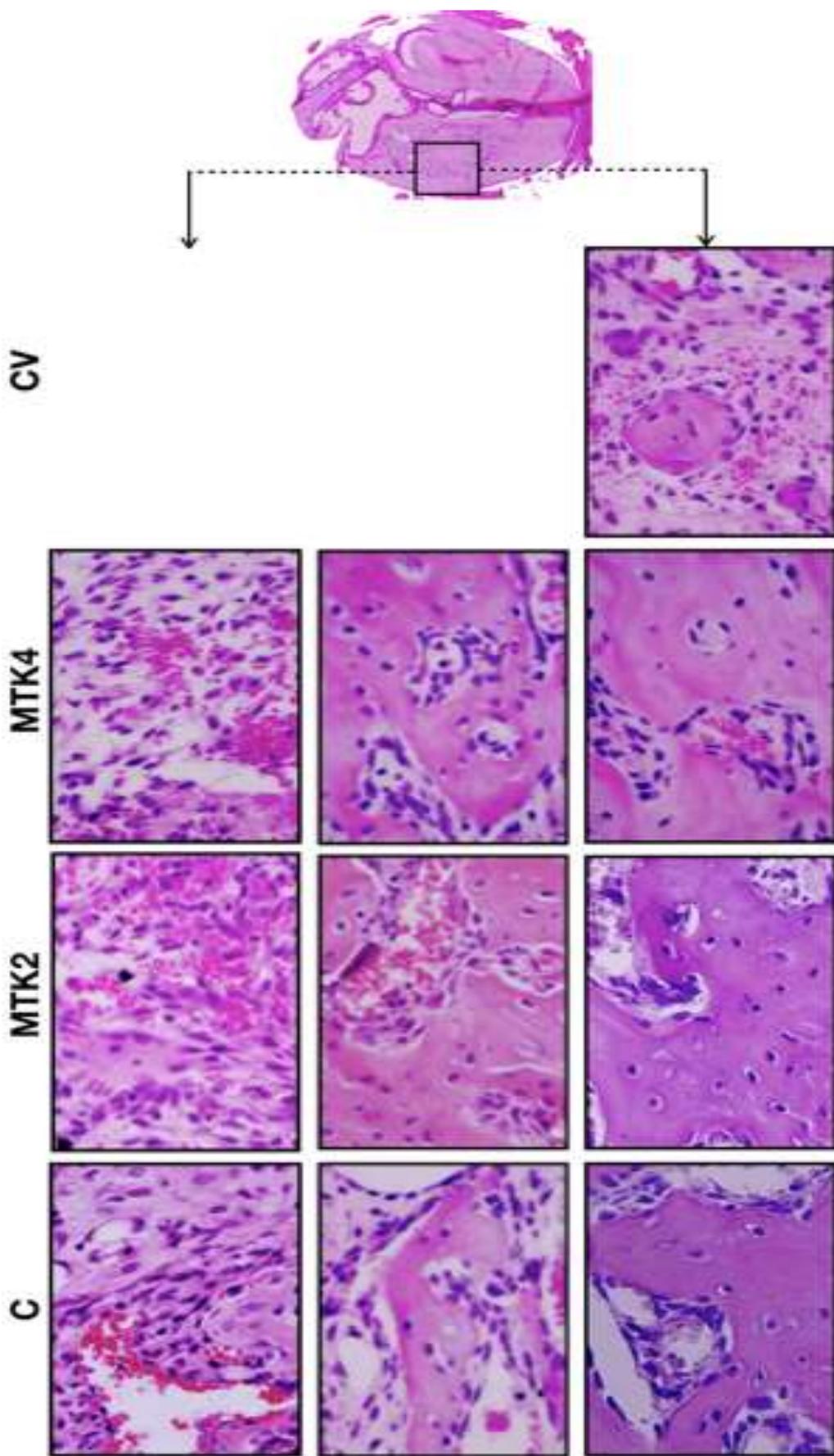
Aos 7 dias, os alvéolos do grupo C apresentaram predominância de tecido de granulação. Quanto aos grupos MTK2 e MTK4 apresentaram aspecto histopatológico bastante similares ao longo dos períodos analisados, sendo que aos 7 dias os alvéolos apresentavam-se preenchidos por tecido de granulação com numerosos vasos sanguíneos e moderado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear difuso. De permeio, observaram-se focos de coágulo sanguíneo, bem como atividade osteogênica com discreta deposição de matriz óssea.

Aos 14 dias, os alvéolos do grupo C apresentaram predominância de tecido ósseo neoformado. Quanto aos grupos MTK2 e MTK4, as trabéculas ósseas neoformadas apresentavam-se espessas e em fase de maturação, além de ser possível observar uma discreta atividade osteoclástica.

No período de 21 dias, os alvéolos do grupo C já se encontravam preenchidos por tecido ósseo em fase de maturação. Já os alvéolos dos grupos MTK2 e MTK4 mostravam-se preenchidos por espessas trabéculas ósseas regulares em fase de maturação, ora revestidas por osteoblastos, ora por células de revestimento, apresentando discretas áreas com atividade osteoclástica. Neste mesmo período, chamou atenção o atraso no processo de reparo do grupo CV, os quais exibiam alvéolos preenchidos predominantemente por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado, com discreto infiltrado inflamatório mononuclear e eventuais polimorfonucleares neutrófilos. Na periferia dos alvéolos, bem como permeando o tecido conjuntivo, viam-se trabéculas ósseas neoformadas, ora em maturação, ora em remodelação. Também foram observados discretos focos de atividade osteogênica.



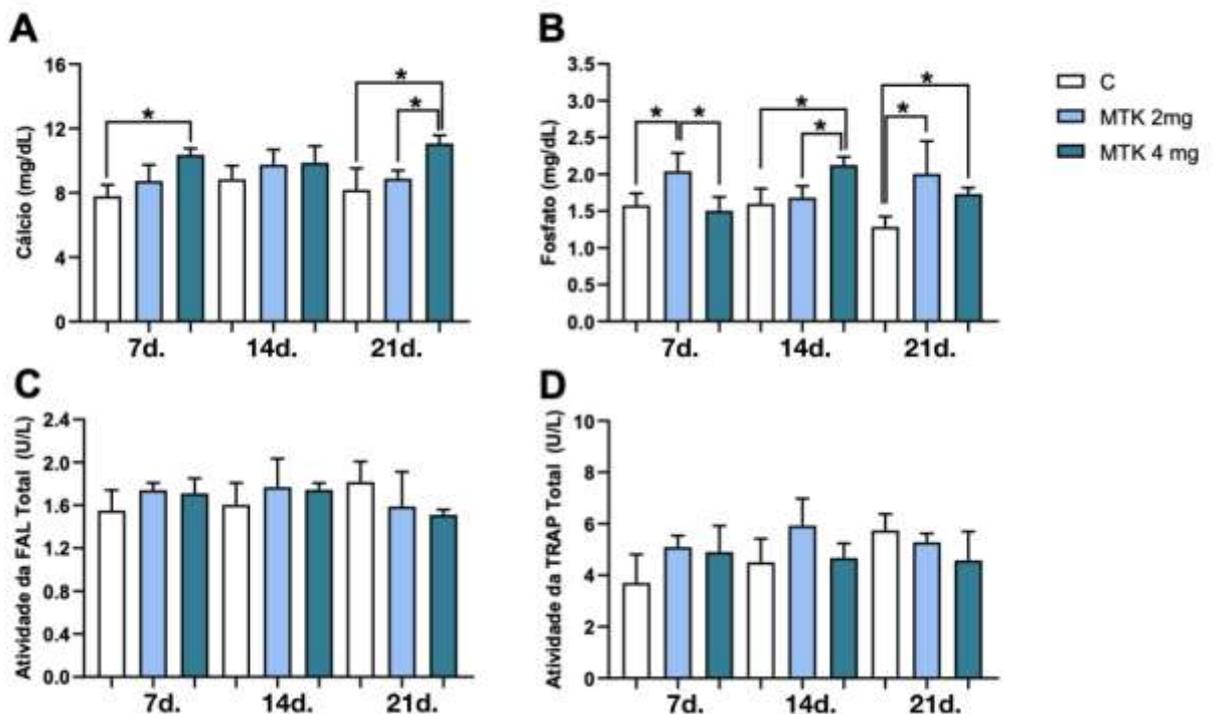
**Figura 6.** Análise histológica do processo de reparo alveolar dos grupos C, MTK2, MTK4 e CV, nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental, onde nota-se: preservação da cortical alveolar (**setas pretas**); presença de coágulo (**Cg**); evolução para tecido de granulação (**Tg**) e início de neoformação óssea (**seta branca**) aos 7 dias; trabéculas ósseas neoformadas (\*) aos 14 e 21 dias nos grupos C, MTK2 e MTK4. Atraso de neoformação óssea no grupo CV. Coloração HE; objetiva de 10x.



**Figura 7.** Imagens representativas do aspecto histopatológico dos grupos C, MTK2, MTK4 e CV aos 7, 14 e 21 dias experimentais (HE; aumento original 100x).

### 4.3 Resultados de marcadores plasmáticos

Os níveis de cálcio (mg/dL) observados na figura 8A foram significativamente maiores no grupo MTK4 ( $10,36 \pm 0,40$  e  $11,07 \pm 0,51$ ) comparado aos controle ( $7,80 \pm 0,71$  e  $8,19 \pm 1,34$ ) aos 7 dias, enquanto que aos 21 dias, os valores de MTK4 foram significativamente maiores que os do MTK2 ( $8,73 \pm 1,00$  e  $8,90 \pm 0,50$ ) e controle. Os valores do fosfato (mg/dL) apontaram aumento significativo no grupo MTK2 ( $2,26 \pm 0,54$  e  $2,00 \pm 0,44$ ) em comparação ao MTK4 ( $1,74 \pm 0,50$  e  $1,73 \pm 0,08$ ) e grupo C ( $1,66 \pm 0,30$  e  $1,28 \pm 0,14$ ) aos 7 e 21 dias (Fig. 8B). No entanto, aos 14 dias, o grupo MTK4 mostrou aumento significativo com  $2,12 \pm 0,11$  comparado ao MTK2 com  $1,68 \pm 0,16$  e C com  $1,60 \pm 0,20$  (Fig. 8B). Não foram detectadas diferenças significantes para FAL (Fig. 8C) e para a TRAP (Fig. 8D).



**Figura 8.** Parâmetros bioquímicos plasmáticos do metabolismo ósseo entre os grupos C, MTK2 e MTK4. **(A)** Cálcio, **(B)** Fosfato, **(C)** Atividade da fosfatase alcalina total (FAL), e **(D)** atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato total (TRAP).(\*) Diferenças estatísticas entre os grupos. Foi utilizado o teste de análise de variância

(ANOVA) de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos pelo presente estudo foi possível confirmar o efeito tempo e dose-dependente da droga antagonista de CisLTs no curso do reparo ósseo intramembranoso de alvéolos dentários de camundongos, bem como nos níveis de cálcio e fosfato.

Considerando-se a saúde geral dos animais, a inibição de CisLTs parece não ter interferido negativamente em seus processos fisiológicos. Clinicamente, os animais apresentaram fenótipo e peso similar em comparação aos Controles (dados não apresentados), diferentemente de animais 5-LOKO que possuem um fenótipo mais robusto, uma vez que esta inibição resulta em um animal que apresenta uma matriz óssea mais cortical e hiperdensa em comparação com animais WT – selvagens (do inglês, *Wild Type*) já observados em um estudo anterior do nosso grupo [35], além de apresentarem menor número de osteoclastos e conseqüentemente, diminuição do *turnover* ósseo e possibilidade de manutenção de sua massa óssea ao longo do tempo, observado em estudos preliminares usando outras linhagens [12].

Roedores são comumente usados em estudos de biologia óssea e para testar novas drogas. A escolha da linhagem utilizada baseou-se em estudos prévios de fenotipagem óssea, que mostraram que os camundongos 129Sv/Ev apresentam uma maior densidade óssea quando comparado a outras linhagens populares como os C57Bl/6 [54,55]. Estudos utilizando camundongos nocauteados para determinado gene são úteis para entender como sua deleção afeta determinado comportamento. No entanto, devido a algumas limitações como impossibilidade de replicação clínica, a utilização de animais selvagens é preferível pois permite a aplicação de outros mecanismos para fins semelhantes, como o uso de drogas bloqueadoras de produtos gerados por vias específicas.

Sabe-se que as enzimas que metabolizam o A.A. interferem na homeostasia do tecido ósseo, bem como no processo de reparo deste tecido, sendo a COX-2 responsável pela osteoblastogênese [20,21] e os LTs derivados da 5-LO pela osteoclastogênese e reabsorção óssea [23]. Sendo assim, o emprego de drogas que apresentam um efeito inibidor específico para CisLTS, como o MTK, nos permite analisar seu efeito pontual diante de uma condição de injúria óssea [30,37,38,39].

Os resultados obtidos no presente estudo são bastante promissores, uma vez que a influência desta inibição em ossos intramembranosos é inédita. Estudos pioneiros a respeito da influência dos metabólitos da 5-LO no metabolismo ósseo se concentravam nas evidências demonstradas na porção cortical do tecido [11,23,29]. Do mesmo modo, estudo anterior utilizando animais geneticamente modificados para a enzima 5-LO já demonstrou a aceleração no processo de neoformação óssea pós-injúria, porém, em modelo de fratura de osso endocondral [29,30,31]. No entanto, foram as evidências obtidas em investigação a respeito da fenotipagem esquelética de camundongos 129Sv/Ev 5-LOKO que incentivaram o desenvolvimento do presente estudo, uma vez que foi demonstrada um resultado benéfico de tal deleção sobre a qualidade microarquitetural trabecular das regiões de metáfise distal do fêmur e vértebra L5 [32]. Considerando-se a qualidade e natureza do osso maxilar e da necessidade de se fornecer condições favoráveis para um processo de reparo do alvéolo dentário pós-extração a fim de permitir procedimentos reabilitadores mais promissores, desenvolveu-se o presente estudo. Assim, a compreensão dos efeitos da administração cumulativa de MTK no osso pode fornecer estratégias para melhorar e acelerar o reparo ósseo, comparando diferentes dosagens de drogas.

No presente estudo, analisamos duas dosagens de MTK (2 mg/kg/dia e 4 mg/kg/dia) ao longo de três períodos experimentais (7, 14 e 21 dias), a fim de se analisar o efeito tempo-dose-resposta do medicamento e possíveis resultados distintos. Na literatura não foram encontrados estudos prévios utilizando estas dosagens. No entanto, baseou-se em estudos que mostram a segurança no tratamento da asma em humanos adultos, utilizando 10 mg/dia [39] e estudos em modelos de roedores com foco na análise do processo de reparo ósseo de ossos longos, utilizando 1,5 mg/kg/dia por 7 e 21 dias [32] e 5 mg/kg/dia, por períodos mais longos de 12 semanas [30]. Em um estudo prévio de nosso grupo, avaliamos a influência do MTK nos fêmures e vértebras sobre os parâmetros microtomográficos utilizando as dosagens de 2 mg/kg/dia e 4 mg/kg/dia (artigo em processo de submissão). Quanto aos tempos experimentais, os mesmos foram definidos baseando-se em estudos prévios em camundongos C57BL/6-WT [44,55], onde o tempo de 21 dias é considerado o estágio de finalização do processo de reparo, devido a maior quantidade de osso observada (em relação a períodos mais prolongados) e presença de tecido ósseo lamelar permeado por medula.

Existem evidências do papel do MTK na remodelação óssea, já que os LTs são mediadores presentes no processo inflamatório. Estudos anteriores em roedores, mostram que o tratamento com o MTK suprime e regula a formação de osteoclastos [30,56,57], diminui a perda óssea em condições homeostáticas em camundongos machos em condições inflamatórias [30, 58], assim como resgata a perda óssea de fêmeas OVX [30,56] e acelera o reparo em fraturas de ossos longos [32,59]. Em um estudo prévio de nosso grupo, foi possível observar uma melhora da microarquitetura óssea, dos ossos endocondrais, embora nosso modelo animal não tenha sido submetido a nenhum procedimento cirúrgico ou intervenção sistêmica, apresentando portanto, menor predisposição à perda óssea. No entanto, essa condição fortaleceu o potencial terapêutico usado do MTK para o tratamento de doenças que envolvem destruição óssea, devido a sua capacidade para melhorar a massa óssea.

Nas reconstruções obtidas por microCT, verificamos presença de espaço predominantemente hipodenso dos alvéolos dentais no período de 7 dias, correspondente ao espaço preenchido predominantemente por tecido de granulação nos cortes histológicos, em todos os grupos analisados. Aos 14 dias, todos os grupos apresentavam aumento de hiperdensidade preenchendo grande parte da extensão dos alvéolos dentários, especialmente para os grupos tratados com o MTK, onde a presença de trabéculas ósseas mineralizadas foi mais evidente e, confirmada pela análise histológica descritiva. O mesmo foi observado aos 21 dias, em que os grupos tratados apresentavam uma maior hiperdensidade em toda extensão do alvéolo, também sendo observado pela histologia. Já o grupo CV apresentava maior área hipodensa, mostrando um atraso do reparo ósseo em relação aos outros grupos, correspondendo a tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado nos cortes histológicos. As características microarquitetura da matriz óssea mineralizada no interior dos alvéolos dentários dos animais tratados com o MTK demonstrados pela análise do microCT, revelaram claro efeito tempo-dose dependente da droga na melhora dos parâmetros analisados. Considerando-se a fração de volume ósseo (BV/TV) e espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), observou-se que estes efeitos são mais significativos a partir do décimo quarto dia pós-operatório, continuando até o período final de análise (21 dias). As características da microarquitetura óssea reveladas pelos animais tratados com MTK podem ser devidas a uma maior disponibilidade de COX-2 quando os metabólitos 5-LO são bloqueados, produzindo

assim, níveis anormalmente altos de prostaglandinas, favorecendo a osteoblastogênese [27,27,34,35]. O aumento da densidade mineral óssea alveolar associado com maiores níveis de cálcio plasmático em relação ao grupo C, sugere que MTK4 exerce influência na homeostase do cálcio otimizando o metabolismo ósseo. De fato, a mineralização da matriz osteóide apresenta uma correlação positiva entre absorção intestinal de cálcio e os seus níveis plasmáticos [60,61]. Entretanto, o aumento do cálcio plasmático também pode ser relacionado com a redução da sua taxa de excreção renal e o aumento da sua liberação óssea por meio da atividade osteoclástica. Isto nos leva a sugerir que, apesar de bem caracterizado que o MTK atue como antagonista do CisLTR1, cuja transdução do sinal depende do aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular [24], ainda é desconhecido em qual nível da regulação do  $Ca^{2+}$  o MTK pode modular a homeostase de cálcio. Por sua vez, os níveis plasmáticos de fosfato também foram maiores em ambos os grupos tratados com MTK em comparação ao grupo C. Todavia, não foi possível estabelecer correlação entre as variações plasmáticas de cálcio e fosfato no decorrer do período experimental, muito embora a homeostase de ambos estejam finamente interconectadas de tal forma que a proporção entre esses eletrólitos influencia na taxa de absorção intestinal e excreção renal de ambos [62]. Apesar disso, a maior densidade mineral óssea alveolar nos grupos tratados sugere que MTK também favoreceu a homeostase do fosfato, que exerce função crítica para a formação do fosfato de cálcio, essencial para a mineralização óssea [63].

Os resultados microarquiteturais da matriz óssea mineralizada nos auxilia sobremaneira no entendimento da qualidade do tecido ósseo neoformado considerando a microarquitettura da matriz mineralizada; no entanto, a histopatologia nos revela aspectos importantes sobre a dinâmica da reparação óssea, especialmente nos seus períodos iniciais. Apesar da ausência de diferenças entre os grupos aos 7 dias apontadas pela microCT, a presença e distribuição da deposição inicial da matriz óssea ficou evidente nos cortes corados com HE. Enquanto o grupo C exibia uma formação óssea predominantemente a partir das paredes dos alvéolos, nos animais tratados com ambas as doses do MTK essa formação óssea ocorria em todo o alvéolo, levando a uma organização dos espaços medulares mais precoce. Cabe ressaltar a importância do grupo CV, que revelou resultados interessantes, comprovando a influência do estresse durante a manipulação diária do animal no processo de reparo alveolar. Em todos os parâmetros de análise este foi o grupo que apresentou

resultados significativamente inferiores em comparação com os grupos experimentais e, especialmente, com o grupo C. Cabe enfatizar que a opção em se analisar somente um período do reparo foi devido ao interesse em analisar o efeito do estresse pela manipulação do animal na reparação final do alvéolo (grupo CV), e não durante o curso do processo, uma vez que este já sinaliza seu efeito negativo.

Estudos focados no modelo de camundongos fêmeas OVX sugerem que MTK atenua a perda de volume ósseo, bem como o número trabecular de fêmures e vértebras, observado por microCT [30,56]. Além disso quando este mesmo modelo é analisado histopatologicamente, é possível confirmar que o MTK melhora a perda óssea induzida pela OVX ao suprimir a atividade de osteoclastos [30,56]. Estudos focados em fraturas dos ossos longos, apontam que a fratura nos animais tratados com MTK exibem reparo aprimorado quando comparados aos controles [32,59], sendo também observado no presente estudo por meio de microCT dos alvéolos, especialmente para os 21 dias. Estes estudos prévios de fratura em fêmures, apontam que os grupos tratados exibem um aumento do tamanho da calosidade e formação óssea mais precoce quando comparados com os controles já no dia 7, sendo observado por meio de radiografias. O MTK tem como alvo direto o CisLTR1, levando ao aumento da proliferação de condrócitos em momentos iniciais [32]. Em nossos resultados, esta diferença por meio de exame de imagem não foi observada nos períodos de 7 dias, porém através da análise histológica descritiva, foi possível observar uma formação óssea mais acelerada nos grupos tratados com MTK.

Os marcadores de remodelação óssea sistêmica foram usados para demonstrar possíveis correlações com os efeitos biológicos do MTK no osso alveolar após a exodontia. Com relação aos níveis plasmáticos da FAL, um marcador de formação óssea sistêmica, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos, embora o aumento do BV/TV foi nitidamente observado pelos resultados da microCT nos grupos MTK2 e MTK4. O estudo do efeito do exercício físico e do raloxifeno na microarquitetura óssea do colo do fêmur de ratas senis também não demonstrou correlação entre BV/TV e FAL plasmática [64], enquanto a imunomarcagem com osteocalcina demonstrou ser coerente com os efeitos anabólicos de ambos os tratamentos. Isto sugere, que outras proteínas da matriz extracelular óssea podem estar envolvidas na regulação do processo de mineralização induzido pelo MTK, como a sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina. Além disso, para

os níveis de TRAP, um marcador plasmático de reabsorção óssea, também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos e períodos. Após administração do MTK, esperava-se uma associação dos níveis plasmáticos de TRAP devido à redução de osteoclastogênese causada pelo mesmo. Nossa hipótese é que o efeito do MTK ocorreu apenas localmente no tecido ósseo. Sendo assim, a TRAP não seria adequado como biomarcador sistêmico de reabsorção óssea para o modelo em questão. De forma semelhante, a TRAP sistêmica não foi efetiva em representar o efeito do raloxifeno no fêmur de ratas OVX, enquanto a análise imunoistoquímica permitiu constatar a redução da imunomarcagem da TRAP no colo do fêmur desses animais [65]. Frente a esta hipótese sugerimos mais estudos em associação a imunoistoquímica para confirmação da mesma. Embora os resultados obtidos pela microCT e histologia descritiva tenham sido benéficos, não observamos correlação com os biomarcadores de formação e remodelação óssea.

Nossos resultados mostram que o uso do MTK promoveu neoformação óssea precoce e melhora na qualidade do tecido ósseo ao longo do processo de reparo na dose de 4mg, neste modelo experimental e destacando o papel do CisLTR1 como um regulador negativo sobre o reparo ósseo. No entanto, estudos adicionais são necessários a fim de se investigar os efeitos do MTK sobre as células ósseas em níveis moleculares, bem como o comportamento do tecido ósseo neoformado após a interrupção do tratamento.

## **6 CONCLUSÃO**

Considerando os resultados obtidos, concluiu-se que o MTK exerceu efeito positivo tempo e dose dependente sobre o processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos 129Sv/Ev, acelerando a deposição de matriz óssea em comparação aos animais e interferindo nos níveis plasmáticos de cálcio e fosfato neste presente modelo animal.

## REFERÊNCIAS

- [1] C.S. Chen, J.R. Shelter, E.N. Johnson, C.D. Funk, Role of leukotrienes revealed by target disruption of the 5-lipoxygenase gene, *Nature*. 372 (1994) 179-182.
- [2] O. Werz, D. Steinhilber, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 701-718.
- [3] B.D. Lascelles, S. King, S. Roe, D.J. Marcellin-Little, S. Jones, Expression and activity of COX-1 and 2 and 5-LOX in joint tissues from dogs with naturally occurring coxofemoral joint osteoarthritis, *Journal of Orthopaedic Res.* 27 (2009) 1204-1208.
- [4] S.P. Mathis, J.R. Jala, D.M. Haribabu, Nonredundant roles for leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis, *The Journal of Immunol.* 185 (2010) 3049-3056.
- [5] G.A. Sanchez, V.A. Miozza, A. Delgado, L.J. Busch, Salivary IL-1B and PGE2 as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment, *Journal of Periodontology*. (2013).
- [6] F.E. Eriksen, Cellular mechanisms of bone remodeling, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 11 (2010) 219-27.
- [7] H.K. Datta, W.F. Ng, J.A. Walker, S.P. Tuck SP, S.S. Varanasi, The cell biology of bone metabolism, *J. Clin. Pathol.* 61 (2008) 577-587.
- [8] R. Florencio-Silva, G.R Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simões, P.S. Cerri, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells, *Biomed. Res. Int.* (2015).
- [9] L. Batoon, S.M. Millard, L.J. Raggatt, A.R. Pettit, Osteomacs and Bone Regeneration, *Curr. Osteoporos. Rep.* 15 (2017) 385-395.
- [10] J.Sodek, M. Mckee, Molecular and cellular biology of alveolar bone, *Periodontology*. 24 (2000) 99-126.
- [11] L.F. Bonewald, "The amazing osteocyte," *J. Bone Miner. Res.* 26 (2011) 229-238.
- [12] L. Ginaldi, M. De Martinis, Osteoimmunology and Beyond, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 3754-3774.

- [13] K. Matsuo, N. Irie, Osteoclast-osteoblast communication, *Arch. Biochem. Biophys.* 473 (2008) 201-209.
- [14] C. Franco, H.R. Patricia, S. Timo, B. Claudia, H. Marcela, Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 440.
- [15] S. Khosla, M.J. Oursler, D.G. Monroe, Estrogen and the skeleton, *Trends in Endocrinol. and Metabolism.* 23 (2012) 576-581.
- [16] S.C. Manolagas, Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocrine Rev.* 21 (2000) 115-137.
- [17] C. Sobacchi, A. Schulz, F.P. Coxon, A. Villa, M.H. Helfrich, Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function, *Natur. Rev. Endocrinol.* 9 (2013) 522-536.
- [18] M.G. Araujo, C.O. Silva, M. Misawa, F. Sukekava, Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontology.* 68 (2000) 122-134.
- [19] L.F. Bonewald, M. Flynn, M. Qiao, M.R. Dallas, G.R. Mundy, B.F. Boyce. Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. *AdvExp Med Biol.* (1998) 299-302.
- [20] S.H. Ferreira, J.R. Vane, Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation, *Nature.* 216 (1967) 868-73.
- [21] E. Sigal, The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism, *Am J Physiol.* 260 (1991) 13-28.
- [22] M. Peters-Golden, W.R. Henderson-Jr, Leukotrienes, *N Engl. J Med.* (2007) 181841-54.
- [23] H. Kawaguchi, C.C. Pilbeam, J.R. Harrison, L.G. Raisz, The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism, *Clin Orthop.* (1995) 36-46.

- [24] D.L. Simmons, D.B. Levy, Y. Yannoni, R.L. Erikson, Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene, *Proc. Natl academic USA*. 86 (1989) 1178-1182.
- [25] P.C. Kam, A.U. See, Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role, *Anaesthesia*. 55 (2000) 442-449.
- [26] C. Garcia, B.F. Boyce, J. Gilles, M. Dallas, M. Qiao, G.R. Mundy, L.F. Bonewald, Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo, *J. Bone Miner. Res.* 11 (1996) 1619-1627.
- [27] X. Zhang, E.M. Schwarz, D.A. Young, J.E. Puzas, R.N. Rosier, R.J. O'Keefe, Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair, *J Clin Invest*. 109 (2002) 1405-15. Erratum in: *J Clin Invest*. 110 (2002) 1211.
- [28] A.M. Simon, J.P. O'Connor, Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing, *J Bone Joint Surg. Am.* 89 (2007) 500-511.
- [29] M.B. Manigrasso, J.P. O'Connor, Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene, *Acta Orthop.* 81 (2010) 748-755.
- [30] J.H. Kang, Z. Ting, M.R. Moon, J.S. Sim, J.M. Lee, K.E. Doh, S. Hong, M. Cui, S. Choi, H.W. Chang, H.Y. Park-Choo, M. Yim, 5-Lipoxygenase inhibitors suppress RANKL induced osteoclast formation via NFATc1 expression, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 7069-7078.
- [31] O. Radmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta.* 1851 (2015) 331-339.
- [32] J.J. Wixted, P.J. Fanning, T. Gaur, S.L. O'Connell, J. Silva, A. Mason-Savas, D.C. Ayers, G.S. Stein, J.B. Lian, 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.* 221 (2009) 31-39.

- [33] J.A. Cottrell, V. Keshav, A. Mitchell, J.P. O'Connor, Local inhibition of 5 lipoxygenase enhances bone formation in a rat model, *Bone Joint Res.* 2 (2013) 41-50.
- [34] W.E. Gallwitz, G.R. Mundy, C.H. Lee, M. Qiao, G.D. Roodman, M. Raftery, S.J.Gaskell, L.F. Bonewald, 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10087-10094.
- [35] C.C. Biguetti, M.C.M. Couto, A.C.R. Silva, J.V.T.C. Shindo, V.M. Rosa, A.L. Shinohara, J.C. Andreo, M.A.H. Duarte, Z. Wang, M. Brotto, M.A. Matsumoto, New Surgical Model for Bone–Muscle Injury Reveals Age and Gender-Related Healing Patterns in the 5 Lipoxygenase (5LO) Knockout Mouse, *Frontiers in Endocrinology.* 11 (2020).
- [36] M. Mehrabian, H. Allayee, J.Stockyon, P.Y. Lum, T.A. Drake, L.W. Castellani et al., Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits., *Nature Genetics.* 37 (2005) 1224-1233.
- [37] D. Saul, M. Ninkovic, M. Komrakova, L. Wolff, P. Simka, T. Gasimov, B. Menger, D. B.Hoffmann, V. Rohde, S. Sehmisch Effect of zileuton on osteoporotic bone and its healing, expression of bone, and brain genes in rats, *J. Applied Physiol.* 124 (2018) 118-130.
- [38] D. Saul, S. Gleitz, H.H. Nguyen, R.L. Kosinsky, S. Sehmisch, D.B. Hoffmann, M. Wassmann, B. Menger, M. Komrakova, Effect of the lipoxygenase-inhibitors baicalein and zileuton on the vertebra in ovariectomized rats, *Bone.* 101 (2017) 134-144.
- [39] H. Matsuse, S. Kohno, Leukotriene receptor antagonists pranlukast and montelukast for treating asthma, *Expert Opin. Pharmacother.* 15 (2014) 353-363.
- [40] A.J. Theron, H.C. Steel, G.R. Tintinger, C.M. Gravett, R. Anderson, C. Feldman, Cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonists as modulators of innate immune cell function, *J. Immunol. Res.* (2014).

- [42] N.Percie-du-Sert, A. Ahluwalia, S. Alam, M.T. Avey, M. Baker M, W.J. Browne, Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0, PLoS. Biol. 18 (2020).
- [43] R.V. Lenth, Java Applets for Power and Sample Size [Computer software]. Retrieved november, 06, 2018 from <http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power>. (2006-9).
- [44] C.C.Biguetti, A.E. Vieira, F. Cavalla, A.C. Fonseca, P.M. Colavite, R.M. Silva et al., CCR2 Contributes to F4/80+ Cells migration along intramembranous bone healing in maxila, but its deficiency does not critically affect the healing outcome, Front. Immunol. (2018).
- [45] A.E. Vieira. Caracterização morfométrica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. (2013).
- [46] D.E. Komatsu, M. Hadjiargyrou, S.M. Udin, N.A. Trasolini, S. Pentylala, Identification and Characterization of a Synthetic Osteogenic Peptide, Calcif. Tissue Int. 97 (2015) 611-623.
- [47] C. Gao, B.P. Chen, M.B. Sullivan, J. Hui, J.A. Ouellet, J.E. Henderson, N. Saran, Micro CT Analysis of Spine Architecture in a Mouse Model of Scoliosis. Front. Endocrinol. (Lausanne). (2015).
- [48] H.V. Connerty, A.R. Briggs, Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone, Am. J Clin Pathol. 45 (1966) 290–296.
- [49] J.A. Daly, G. Ertingshausen, Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the BCentrifiChem, Clin Chem. 18 (1972) 263–265.
- [50] J.M. Granjeiro, E.M. Taga, H. Aoyama, Purification and characterization of a low molecular-weight bovine kidney acid phosphatase, An Acad Bras Cienc. 69 (1997) 451- 446.
- [51] A.J. Janckila, R.N. Parthasarathy, L.K. Parthasarathy, R.S. Seelan, Y.C. Hsueh, J. Rissanen, S.L. Alatalo, J.M. Halleen, L.T. Yam LT, Properties and expression of

human tartrateresistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells, *J Leukoc. Biol.* 77 (2005) 209- 218.

[52] P.M Laidler, E.M. Taga, R.L. Van Etten, Human liver acid phosphatases: cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme, *Arch Biochem Biophys.* 216 (1982) 512-521.

[53] A.H. Chaves-Neto, D. Machado, C.L. Yano, C.V. Ferreira, Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and beta-glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation, *Develop Growth Differ.* 53 (2011) 88-96.

[54] I. Sabsovich, J.D. Clark, G. Liao, G. Peltz, D.P. Lindsey, C.R. Jacobs, W. Yao, T.Z.Guo, W.J. Kingery, Bone Microstructure and its Associated Genetic Variability in 12 Inbred Mouse Strains:  $\mu$ CT Study and In Silico Genome Scan, *Bone* 48 (2008) 439-451.

[55] C.C. Biguetti, A.H. De Oliva, K. Healy, R.H. Mahmoud, I.C. Custodio, D.H. Constantino, E. Ervolino, M.A.H. Duarte, W.D. Fakhouri, M.A. Matsumoto, Medicationrelated osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization, *Plos ONE* (2019).

[56] C. Zheng, S. Xiaoming, Cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) regulates osteoclast differentiation and bone resorption, *Artificial Cells* 46 (2018) 1-7.

[57] J. Wei, S. Chen, C. Huang, W. Guo, S. Yang, B. Feng, J. Chu, Antagonism of cysteinylleukot-Irene receptor 1 (cysLT1R) by montelukast regulates differentiation of MC3T3-E1 cells under overloaded mechanical environment, *Bioch. Bioph. Res. Communic.* (2017).

[58] J.M. Lee, H. Park, A.L. Noh, J.K. Kang, L. Chen, T. Zheng et al., 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1, *J Immunol.* 11 (2012) 5284-5992.

[59] H. Cakıcı, O. Hapa, K. Gideroğlu, K. Ozturan, M. Güven, H.Y. Yüksel, F. Yılmaz, Theeffects of leukotriene receptor antagonist montelukast on histological, radiological and densitometric parameters of fracture healing, *Joint Dis. Relat. Surg.* 22 (2011) 43-47.

- [60] U. Trechsel, R. Schenk, J.P. Bonjour, R.G. Russell, H. Fleisch, Relation between bone mineralization, Ca absorption, and plasma Ca in phosphonate-treated rats, *Am J Physiol.* (1977) 298-305.
- [61] L.R. Brun, M. Lombarte, S. Roma, F. Perez, J.L. Millán, A. Rigalli, Increased calcium uptake and improved trabecular bone properties in intestinal alkaline phosphatase knockout mice, *J Bone Miner Metab.* 36 (2018) 661-667.
- [62] M. Sun, X. Wu, Y. Yu, Disorders of Calcium and Phosphorus Metabolism and the Proteomics/Metabolomics-Based Research, *Front Cell Dev Biol.* 8 (2020).
- [63] M. Goretti Penido, U.S. Alon, Phosphate homeostasis and its role in bone health [published correction appears in *Pediatr Nephrol.* 2017 Jul 6], *Pediatr Nephrol.* 27 (2012) 2039-2048.
- [64] C.T. Stringhetta-Garcia, S.R.L. Morais, F. Fernandes, M.J. Perez-Ueno, R.P. Almeida, M.J.Q. Louzada, A.H. Chaves-Neto, E. Ervolino, R.C.M. Dornelles, Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats, *Sci Rep.* 31 (2017) 14410.
- [65] C.T. Stringhetta-Garcia, M.P. Singulani, L.F. Santos, M.J. Louzada, A.C. Nakamune, A.H. Chaves-Neto, A.C. Rossi, E. Ervolino, R.C. Dornelles, The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats, *Bone.* (2016) 45-54.

## APÊNDICE

Parâmetros	Períodos/ Grupos	C	CV	MTK2	MTK4
BV/TV (%)	7 dias	13,07±2,09		15,9±3,9	9,2±1,41
	14 dias	33,47±5,5		46,02±5,6	77,37±3,86
	21 dias,	54,83±4,01	42,6±5,27	86,13±2,23	80,01±4
Tb.Th	7 dias	0,12±0,22		0,13±0,04	0,12±0,029
	14 dias	0,16±0,059		0,21±0,025	0,28±0,047
	21 dias	0,42±0,015	0,16±0,064	0,04±0,070	0,21±0,076
Tb.Sp	7 dias	0,61±0,06		0,56±0,08	0,68±0,02
	14 dias	0,2±0,043		0,25±0,012	0,2±0,044
	21 dias	0,14±0,056	0,2±0,043	0,2±0,043	0,24±0,092

Média e desvio padrão da análise quantitativa de microCT

## ANEXO A - CEUA



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 inibição do receptor leucotrieno B4 (LTB4) no processo de repro óssco alveolar em camundongos 129 Sv**", Processo FOA nº 00464-2019, 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 12 de Novembro de 2019.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 08 de Novembro de 2021.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 08 de Dezembro de 2021.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Influence of leukotriene B4 (LTB4) receptor inhibition on alveolar bone repair in 129 Sv mice**", Protocol FOA nº 00464 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 November 12, 2019.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** November 08, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** December 08, 2021.

**Profa. Associada Maria Cristina Rosifini Alves Rezende**  
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, 1133 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP  
Fone (16) 3236-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

## ANEXO B – NORMAS BONE

### GUIDE FOR AUTHORS

---

#### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

#### *Types of article*

Types of articles Bone accepts include:

- 1) Memoriam
- 2) Editorial or Commentary
- 3) Review
- 4) Original Articles
- 5) Rapid Communication
- 6) Case Report
- 7) Technical Note
- 8) Letters and Response to Letter to the Editor
- 9) Erratum/Corrigendum
- 10) Announcements

There are no length or format requirements other than those already shown on the GFA under Article Structure.

#### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)*

*Supplemental files (where applicable)*

#### *Further considerations*

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### *Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### **Studies in humans and animals**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms *sex* and *gender* should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### **Preprints**

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources;

Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

#### *Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

#### *Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## PREPARATION

### NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

#### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

#### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

#### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

### **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and Methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Since there are significant differences in skeletal structure and remodeling between the sexes and strains, it is essential that all animal studies report the age, sex, and strain (e.g., C57BL/6) of animals used.

#### *Key Resources Table*

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results presented in a paper. More information is available here <https://www.elsevier.com/authors/author-resources/key-resources-table>

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Genbank**

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### *Illustration services*

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### *Tables*

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### *References*

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select

the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/bone>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### *Reference style*

**Text:** Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

**List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

#### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For

more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

