

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

ISABELA DO CARMO CUSTODIO

ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DE ALVÉOLOS PÓS EXODONTIA EM
CAMUNDONGOS FÊMEAS SENIS 129/SV-WT E 129 SV/5LOKO TRATADAS COM
BIFOSFONATO DE ALTA POTÊNCIA

BAURU

2020

ISABELA DO CARMO CUSTODIO

ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DE ALVÉOLOS PÓS EXODONTIA EM
CAMUNDONGOS FÊMEAS SENIS 129/SV-WT E 129 SV/5LOKO TRATADAS COM
BIFOSFONATO DE ALTA POTÊNCIA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel em
Odontologia - Centro Universitário
Sagrado Coração.

Orientador: Prof. M.e Leandro de Andrade
Holgado

BAURU

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD

C987a	<p>Custodio, Isabela do Carmo</p> <p>Análise microtomográfica de alvéolos pós exodontia em camundongos fêmeas senis 129/SV-WT e 129SV/5LOKO tratadas com bifosfonato de alta potência / Isabela do Carmo Custodio. -- 2020. 29f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. M.e Leandro de Andrade Holgado</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Osteonecrose dos Maxilares. 2. Reparo ósseo. 3. Bifosfonato. 4. Sistema imunológico. 5. Lipoxigenase-5. I. Holgado, Leandro de Andrade. II. Título.</p>
-------	--

ISABELA DO CARMO CUSTODIO

ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DE ALVÉOLOS PÓS EXODONTIA EM
CAMUNDONGOS FÊMEAS SENIS 129/SV-WT E 129 SV/5LOKO TRATADAS COM
BIFOSFONATO DE ALTA POTÊNCIA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel em
Odontologia - Centro Universitário
Sagrado Coração.

Aprovado em: 09/12/2020.

Banca examinadora:

Leandro de Andrade Holgado

Prof. M.e Leandro de Andrade Holgado (Orientador)
Centro Universitário Sagrado Coração

Cláudia Cristina Bigueti

Prof.^a Dra. Cláudia Cristina Bigueti
University of Texas – Dallas – Departamento de Bioengenharia

Mariza Akemi Matsumoto

Prof.^a Dra. Mariza Akemi Matsumoto
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, FOA/UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais, com
carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Cirley e Venicius e ao meu irmão Daniel, por sempre me apoiarem em todos os momentos e decisões desde o início da minha graduação e vida acadêmica.

Agradeço também ao meu professor e orientador Dr. Leandro de Andrade Holgado, que me ajudou a confeccionar este trabalho de conclusão de curso, além de me ensinar de maneira tão didática as matérias de cirurgia bucomaxilofacial e por ser tão atencioso e prestativo durante as clínicas frente minhas dificuldades.

É impossível não mencionar as Prof.^a Dra. Cláudia Cristina Biguetti e Dra. Mariza Akemi Matsumoto, que conheci através da Prof.^a Dra. Patrícia Saraiva Pinto, minha querida professora de histologia. Elas foram uma enorme inspiração em minha graduação, na qual sou eternamente grata por terem me introduzido ao mundo científico (que é maravilhoso). Toda a minha base científica foi estruturada graças a vocês, que me ensinaram a como ler e interpretar artigos, escrever relatórios, montar painéis e de como apresentá-los. Quero levá-las por toda minha vida, pois além de serem profissionais excelentes, são duas mulheres muito bondosas e humildes de alma e coração.

Gostaria de agradecer também ao apoio financeiro que recebi durante a minha iniciação científica, pela FAPESP (Processo 2018/19409-0). Através dele, pude realizar todo o meu projeto de maneira concisa e proveitosa.

Para finalizar, não poderia me esquecer dos meus melhores amigos de turma: Amanda, Ana Carolina, Gabriela, Guilherme, Juliana, Leonardo, Luiza e Marina. Foi totalmente gratificante ter vocês desde o meu primeiro dia de faculdade e todo esse período inesquecível, marcado por momentos de luta e glória. Sei que seremos unidos para sempre, pois creio que sem vocês, metade da minha história seria apagada.

“A essência da vida é andar para a frente; sem possibilidade de fazer ou intentar marcha a trás. Na realidade, a vida é uma rua de sentido único.” (Agatha Christie)

RESUMO

O uso de bifosfonatos nitrogenados de alta potência, como o zoledronato, são indicados para o tratamento de diversas doenças ósseas, principalmente a osteoporose, pois possuem uma ação antirreabsortiva. No entanto, a sua utilização possui um fator de risco para o desenvolvimento das Osteonecroses dos Maxilares Associadas ao uso de Medicamentos (OMAM's), em que o reparo ósseo pode ser prejudicado ou acelerado. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o desenvolvimento da OMAM e do reparo ósseo, sob o uso de ácido zoledrônico em camundongos fêmeas senis 129 Sv/ Wild Type (WT) e geneticamente deficientes para a enzima 5-lipoxigenase (129 Sv 5LOKO). Para tanto, foram utilizados no total 40 camundongos, sendo divididos em dois grupos: 20 129 Sv-WT e 20 129 Sv 5LOKO, de 64 semanas. Os animais foram submetidos a exodontia do incisivo superior direito e coletados espécimes após 7 e 21 dias pós o procedimento cirúrgico. Os camundongos foram divididos de acordo com o tratamento: Controle (tratados com solução fisiológica 0,9%) e ZL (administração via IP de 0,1 mL de ácido zoledrônico [ZL] na dose de 0,250ug/kg) iniciando-se os tratamentos 4 semanas prévias a cirurgia e continuadas após os completos períodos experimentais de 7 e 21 dias. Após as eutanásias, 5 espécimes de cada grupo e período experimental foram fixados em formalina 10% e submetidos a escaneamento para microCT. Os espécimes escaneados por microCT foram reconstruídos para análise tridimensional e quantitativa de tecido ósseo neoformado no interior dos alvéolos pós extração. Após obtenção dos dados quantitativos, os mesmos foram submetidos à análise estatística com nível de significância estabelecido em 5%. A análise por microCT mostrou que animais WT ZL apresentaram menor hiperdensidade e reparo comprometido enquanto que animais 5LOKO Controle e ZL apresentaram um reparo ósseo acelerado e maior hiperdensidade de tecido mineralizado. Concluiu-se que o zoledronato prejudicou mais o grupo WT, interferindo no reparo ósseo e que o grupo 5LOKO apresentou uma forma mais atenuada da OMAM, validando um papel ativo desta enzima nestas condições.

Palavras-chave: Osteonecrose dos Maxilares. Reparo ósseo. Bifosfonato. Sistema imunológico. Lipoxigenase-5.

ABSTRACT

The use of nitrogen containing bisphosphonates (nBP), like zoledronate, are indicated to the treatment of several bone diseases, such as osteoporosis, because they have an anti-reabsorption action. However, your utilization have a risk factor of develop medication related osteonecrosis of jaw (MRONJ) - like lesions, presenting bone repair considerably harmed or accelerated. Then, this study aims was to analyze the development of (MRONJ)-like lesions and bone repair, under the use of zoledronate acid in senior female mice 129 Sv/ Wild Type (WT) and genetic disruption for the enzyme 5-lipoxygenase (129 Sv 5LOKO). Thus, it was used at total 40 mice, being divided in two groups: 20 129 Sv-WT and 20 129 Sv 5LOKO, at the age of 64 weeks. The animals were submitted to the right upper incisor extraction and collected specimens at after 7 and 21 days post surgery. The mice were divided according to treatment: Control (treated with saline solution, at 0,9%) and ZL (intraperitoneal inection of 0,1mL of Zoledronic Acid [ZA] at the dosage of 250ug/kg) starting the treatment 4 weeks before the surgeries and continuing until the end of experimental periods (7 and 21 days). After the euthanasias, 5 specimens of each group and experimental period will be fixed in 10% formalin and submitted to the microCT scanning. The specimens were scanned by microCT and rebuilt for the tridimensional analysis and quantitative of newly formed bone inside of alveolar sockets after tooth extraction. After obtaining the quantitative data, the same were applied to the statistical analysis with a significance level 5%. The analysis by microCT showed that animals WT ZL presented lower hiperdensity and bone repair while 5LOKO animals showed an accelerated bone repair with lower hiperdensity of mineralized tissue. Concluded that zoledronate harmed more the WT group, interfering on bone repair and that 5LOKO group presented attenuated signs of MRONJ-lesions, validating an active role of this enzyme in this condition.

Keywords: Osteonecrosis of Jaw. Bone Repair. Bisphosphonates. Immunological system. 5-lipoxygenase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Análise microtomográfica dos alvéolos pós extração.....	20
Figura 2 - Análise microtomográfica em 2D e 3D dos alvéolos pós extração.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos grupos de acordo com o tipo de tratamento	16
Tabela 2 - Valores das médias e desvio padrão dos grupos analisados.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LT	Leucotrieno
OMAM	Osteonecrose dos Maxilares Associada a Uso de Medicamentos
WT	Wild type
ZL	Zoledronato
5-LO	5-lipoxigenase
5-LOKO	5-lipoxigenase knock out

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2	OBJETIVO.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	ANIMAIS	15
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	15
3.3	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DOS ESPÉCIMES	16
3.4	MICROTOMOGRÁFIAS COMPUTADORIZADAS	16
4	RESULTADOS.....	18
4.1	MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICROCT)	18
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O bifosfonato é um tipo de medicamento utilizado principalmente para tratar doenças ósseas metabólicas tais como a osteoporose, Doença de Paget, mieloma múltiplo e em casos de metástase óssea nas neoplasias malignas.

Seu mecanismo de ação primário é através da inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos (WOO; HELLSTEIN; KALMAR, 2006).

Esse grupo de medicamentos alteram o metabolismo ósseo, através de sua ação inibidora nas células osteoclásticas (que fazem a reabsorção da matriz óssea), atuando na inibição da migração e diferenciação das células precursoras de osteoclastos. Essa inibição faz com que haja a indução da perda da borda corrugada e conseqüentemente a apoptose dessas células. (GOYTIA; SALAMA; KHANUJA, 2009).

Todavia, sabe-se que medicamentos antirreabsortivos, principalmente os bifosfonatos nitrogenados, possuem um grande fator de risco para o desenvolvimento da Osteonecrose dos Maxilares Associada ao uso de Medicamentos, cujo a sigla é (OMAM), devido aos seus efeitos colaterais no tecido ósseo, como a petrose óssea, baixa angiogênese e nível de capacidade de resposta imunológica reduzida.

O uso prolongado de bifosfonatos podem suprimir o turnover ósseo a um ponto em que os microdanos persistam e fiquem acumulados. (MASHIBA *et al.*, 2005). O resultado é de um osso com baixa remodelação e baixa competência biomecânica. Embora a função dos osteoblastos seja também reduzida durante a terapia com bifosfonatos, suas lacunas ósseas continuam mineralizando, porém com uma aparência de osso petroso e aumento do risco de fraturas. (ODVINA *et al.*, 2005).

A Osteonecrose dos Maxilares Associada ao uso de Medicamentos (OMAM) é caracterizada pela exposição óssea na cavidade oral, que não cicatriza em um período de 8 semanas em pacientes que não realizaram radioterapia nos maxilares. Segundo a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS), para ser diagnosticado com OMAM, o paciente deve apresentar características como tratamento prévio/atual com bisfosfonatos, antirreabsortivos ou agentes antiangiogênicos. (RUGGIERO *et al.*, 2014). Geralmente, a região mais acometida é a região posterior de mandíbula, devido a menor espessura de mucosa, baixa

vascularização, osso compacto e também por ser uma região comum das exodontias.

Diante das evidências apontadas nos parágrafos acima que explicam como o reparo ósseo é comprometido durante o uso de bifosfonatos (como por exemplo, o zoledronato), tornou-se oportuno estudar também para melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos, a via 5-lipoxigenase (5-LO), que é uma via que atua na reabsorção óssea através dos leucotrienos.

Os leucotrienos podem ser classificados em cisteinil leucotrienos (leucotrienos C4, D4 e E4), (LTC4, LTD4 e LTE4) e leucotrieno B4 (LTB4). Os cisteinil leucotrienos (CysLTs) são sintetizados principalmente por basófilos, mastócitos e eosinófilos, enquanto que macrófagos e neutrófilos geram principalmente LTB4. (MOURA *et al.*, 2013).

A descoberta que células ósseas possuem tal sistema enzimático e, portanto, produzem LTs suscitou interesse acerca do papel destes mediadores sobre a remodelação óssea (COLLET *et al.*, 2009). Estudos passados indicaram que metabólitos da via 5-LO estimulam osteoclastos a reabsorver osso *in vitro* (GALLWITZ *et al.*, 1993) e a reabsorver matrizes calcificadas, à medida que, aumentam a expressão de TRAP. (FLYNN *et al.*, 1999).

Neste sentido, a comparação do reparo ósseo pós exodontia em animais fêmeas e senis, em uma condição controle (WT) ou em 5-lipogenase knock out (5-LOKO), pode contribuir para elucidar e confirmar se a patogênese da OMAM está diretamente envolvida com a supressão de osteoclastos em indivíduos de idade avançada ou se outros fatores imunológicos também são afetados. Destaca-se aqui que será realizado o estudo do reparo ósseo, pois o desenvolvimento das OMAM ainda não está caracterizado no presente modelo animal, considerando o sexo e a idade do animal, de modo que tal caracterização será desenvolvida durante a realização deste trabalho.

2 OBJETIVO

O presente trabalho propõe a análise qualitativa e quantitativa por micro CT das áreas de reparação óssea alveolar pós exodontia em camundongos fêmeas senis 129/Sv-WT vs 129/Sv 5LOKO tratadas ou não tratadas com bifosfonato de alta potência (ácido zoledrônico, ZL).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados para este estudo um total de 40 camundongos da linhagem 129/Sv, sendo 20 WT e 20 5LOKO, fêmeas, os quais foram fornecidos pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (FMRP/USP) e foram mantidos pelo biotério da Universidade Sagrado Coração até atingirem a idade para os experimentos, de 16 meses ou 64 semanas. Até o presente estudo, os animais encontravam-se com 10 meses de idade. Os animais foram mantidos, sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 C), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão, e recebendo água e ração (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) sem restrição até que atinjam a idade para coleta das amostras. O mesmo projeto foi submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Sagrado Coração e encontra-se em fase de avaliação.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Inicialmente os animais foram submetidos à sedação profunda administrada via intraperitoneal (IP), utilizando combinação do sedativo cloridrato de quetamina (75mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) com o relaxante muscular xilazina (5mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA). Para extração do incisivo, foi realizada uma incisão sulcular ao redor do dente incisivo superior (ICS) direito com auxílio de uma sonda exploradora nº5 previamente desgastada. Em ato contínuo, foi realizado divulsão da mucosa inserida com a mesma sonda e com fórceps adaptado para este modelo animal, o dente fora luxado e extraído. Posteriormente, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico 0,9% estéril e a mucosa suturada com fio de nylon 6-0. Todo o procedimento foi feito com auxílio de estereomicroscópio a fim de se possibilitar visualização satisfatória do sítio cirúrgico e evitar possíveis acidentes e traumas desnecessários. Os animais foram alimentados com ração triturada nos próximos 3 dias após o procedimento cirúrgico. Os mesmos foram divididos em três grupos distintos de acordo com o tipo de tratamento como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Divisão dos grupos de acordo com o tipo de tratamento.

Identificação do grupos	Tratamento	n
Grupo Controle WT	WT-129/Sv – Solução fisiológica 0,9%	10
Grupo ZL WT	WT-129/Sv – 250ug IP 1x por semana , durante 4 semanas prévias à cirurgia e até o final dos períodos experimentais	10
Grupo Controle 5LOKO	5LOKO-129/Sv – Solução fisiológica 0,9%	10
Grupo ZL 5LOKO	5LOKO-129/Sv – 250ug IP 1x por semana , durante 4 semanas prévias à cirurgia e até o final dos períodos experimentais	10
Total		40

Fonte: Elaborado pelos autores.

3.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DOS ESPÉCIMES

Após finalização dos períodos experimentais, os animais sendo eutanasiados por meio de injeção IP de barbitúrico (Tiopentax, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Itapira, SP, Brasil) associado a anestésico local xilocaína 2% com adrenalina 1:200.000 (Lidocaína, AstraZeneca, Mississauga, Canadá). Constatada a morte dos animais, os ossos da maxila contendo os alvéolos pós extração foram removidos e dissecados com auxílio de tesouras cirúrgicas e lâminas de bisturi nº15. Imediatamente, os espécimes foram imersos em frascos individuais contendo formalina a 10% tamponada.

3.4 MICROTOMOGRAFIAS COMPUTADORIZADAS

Após fixação em formalina, as maxilas contendo os alvéolos foram lavadas e acondicionadas em álcool 70 para serem escaneadas em equipamento de microCT (SkyScan 1174, Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica), proveniente da Disciplina de Endodontia da FOB/USP, para posteriores análises quantitativa e qualitativa do tecido ósseo (tanto tecido ósseo neoformado em regiões de defeito, quanto tecido ósseo controle para caracterização dos grupos experimentais) (BIGUETTI *et al.*, 2019). Os arquivos obtidos a partir do escaneamento foram reconstruídos e as imagens microtomográficas resultantes foram analisadas por meio do software CTAnalyzer (SkyScan), para quantificação de diferentes parâmetros trabeculares e

corticais. Para ossos com tecido trabecular, foram quantificados os seguintes parâmetros: volume ósseo (BV/TV, %), número de trabéculas (Tb.N, mm), espessura (Tb.Th,mm) e separação de trabéculas (Tb.Sp, mm).

A MicroCT foi utilizada para permitir uma análise interativa da morfologia óssea de todo o alvéolo dental (região de interesse - ROI). As maxilas contendo os alvéolos foram fixadas em formalina, posteriormente lavadas e acondicionadas em álcool 70 o para o escaneamento. Os espécimes foram escaneados em equipamento de microCT (SkyScan 1174v2, Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica), proveniente da Disciplina de Endodontia da FOB/USP, uma vez que o equipamento de Araçatuba encontra-se em manutenção. As imagens resultantes do escaneamento foram reconstruídas no software NRecon, posteriormente realinhadas no software Dataviewer e estão sendo atualmente analisadas por meio do software CTAnalyzer (SkyScan), para quantificação de diferentes parâmetros trabeculares e corticais. As imagens tridimensionais e bidimensionais foram obtidas para descrição qualitativa dos aspectos microtomográficos do reparo alveolar em todos os grupos.

4 RESULTADOS

4.1 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICROCT)

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

Em relação a proporção de osso neoformado (BV/TV, %), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos aos 7 dias. Já no período de 21 dias pós exodontia, o grupo WT Controle apresentou $56,34 \pm 3,8$ % de osso neoformado, enquanto os animais WT tratados com ZL apresentaram $43,55 \pm 5,27$ %, sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,03$). Já os animais 5LOKO não apresentaram diferenças entre si, considerando-se os controles (SF) e os tratados com ZL. De forma importante, o grupo WT ZL e o grupo 5LOKO ZL foram diferentes entre si aos 21 dias, de modo que os animais 5LOKO ZL apresentaram maior neoformação óssea (Figura 1A, Tabela 2).

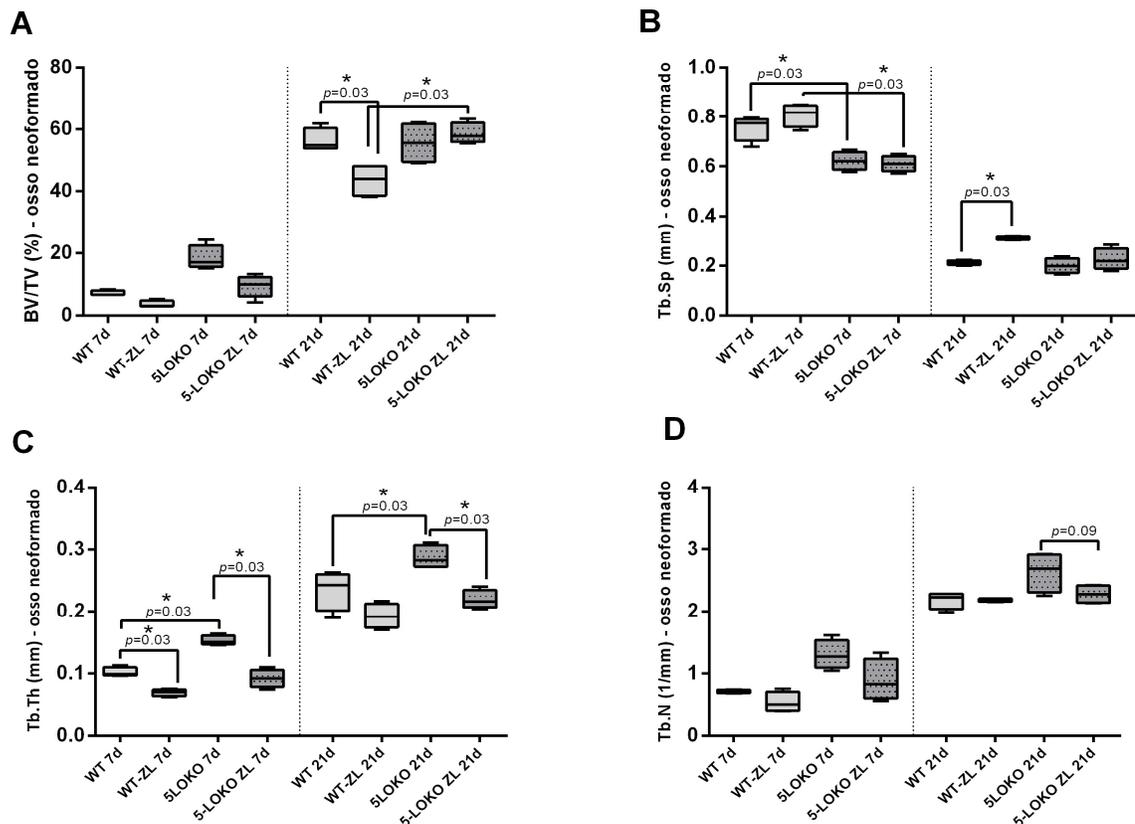
Em relação aos parâmetros morfológicos (Tb.Sp, Tb. Th e Tb.N), os grupos também demonstraram diferenças estatisticamente significantes, de forma coerente com valores de BV/TV. A figura 1B mostra o espaçamento em mm (Tb.Sp) entre as trabéculas ósseas, que foi maior nos grupos WT-ZL comparado ao WT Controle e 5LOKO -ZL comparado 5LOKO controle aos 7 dias. Já aos 21 dias, as diferenças significantes se mantiveram apenas entre WT Controle e WT-ZL, sendo que o espaçamento entre trabéculas continuou aumentado em WT-ZL (Figura 1B, Tabela 2). Inversamente proporcional, a espessura trabecular foi significativamente maior em geral nos grupos WT e 5LOKO controles comparados aos seus respectivos grupos ZL aos 7 dias. Já aos 21 dias, 5LOKO controle apresentou maior espessura trabecular comparado ao WT Controle, e 5LOKO-ZL apresentou menor espessura

comparado ao seu controle (Figura 1C, Tabela 2). Por fim, não houve diferença estatisticamente entre os grupos comparando-se o número de trabéculas (Tb.N). Apenas uma tendência ($p < 0,09$) em que 5LOKO ZL apresentou menor número de trabéculas ósseas comparado ao seu controle 5LOKO (Figura 1D).

Na análise qualitativa, pode-se observar que o grupo WT ZL em comparação ao seu Controle (SF) no período de 21 dias apresentou menor hiperdensidade, indicando um atraso no reparo ósseo e **fratura patológica ao redor do rebordo alveolar**, conforme a Figura 2.

Ao analisar os alvéolos dos animais 5LOKO Controles e 5LOKO ZL, observou-se maior hiperdensidade quando comparados aos WT. Houve a presença de um reparo ósseo alveolar acelerado no grupo 5LOKO Controle com maior área de mineralização óssea em relação ao WT ZL, enquanto que o grupo 5LOKO ZL em comparação ao WT ZL aos 21 dias não apresentou fratura patológica do rebordo alveolar e melhor reparo em relação ao WT ZL.

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



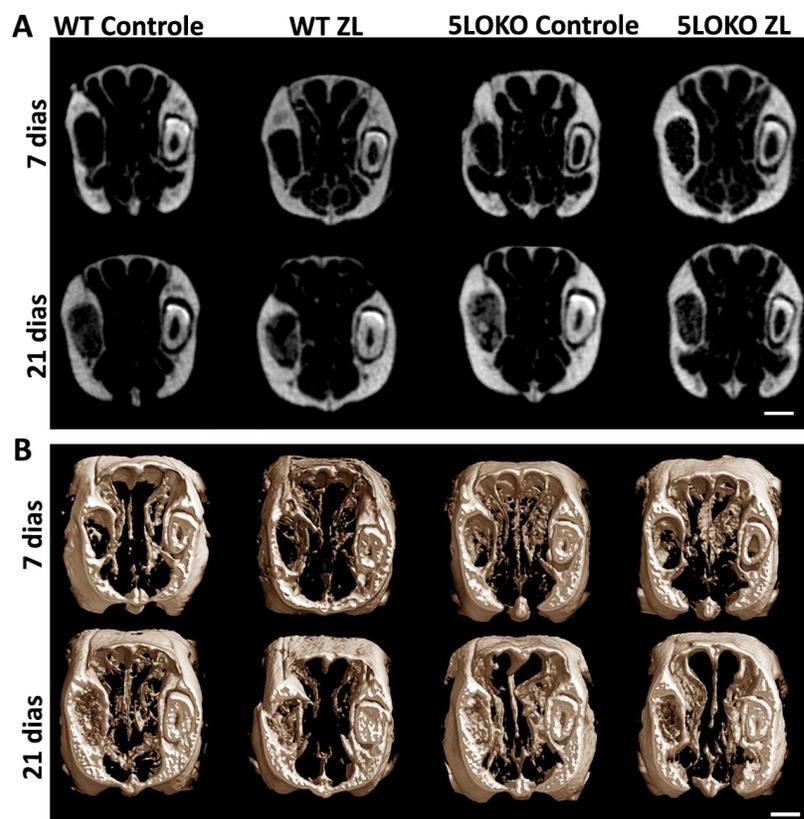
Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 2 - Valores das médias e desvio padrão dos grupos analisados. Análise microtomográfica dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senis WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana).

Dados microtomográficos de neoformação óssea								
períodos	7 dias				21 dias			
grupos	WT	WT-ZL	5LOKO	5LOKO-ZL	WT	WT-ZL	5LOKO	5LOKO-ZL
BV/TV, %	7,08±0,85	3,58±1,15	18,39±4,09	9,36±3,45	56,34±3,8	43,55±5,27	58,55±3,37	55,58±6,65
Tb.N	0,71±0,03	0,54±0,16	1,29±0,24	0,88±0,33	2,18±0,14	2,18±0,03	2,64±0,33	2,28±0,15
Tb.Th	0,11±0,01	0,07±0,01	0,15±0,001	0,09±0,01	0,23±0,03	0,19±0,02	0,28±0,02	0,21±0,02
Tb.Sp	0,76±0,05	0,81±0,04	0,62±0,04	0,61±0,03	0,21±0,01	0,31±0,01	0,19±0,03	0,22±0,04

Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 2 - Análise microtomográfica descritivo em 2D (A) e 3D (B) dos alvéolos pós extração de camundongos fêmeas senis WT vs 5LOKO controles (SF 0,9%) e tratadas com ZL (250ug/Kg - IP 1x por semana).



Fonte: Elaborado pelos autores.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo conseguiu mostrar através das análises feitas pela microarquitetura óssea (microCT), de que o grupo 5LOKO (Controle e ZL) apresentaram tanto uma forma mais atenuada da OMAM quanto um reparo ósseo intramembranoso de alvéolos dentários melhorado em comparação ao grupo 129Sv-Wt (Controle e ZL) frente ao uso do bifosfonato nitrogenado de alta potência. Pode-se observar também de que o zoledronato afetou a qualidade da microarquitetura óssea alveolar, durante o processo de reparo alveolar de forma relevante nos animais WT e 5LOKO, sendo de caráter mais expressivo nos animais WT.

Na análise quantitativa dos dados, vimos que a proporção de osso neoformado (BV/TV, %) foi maior no grupo 5LOKO ZL quando comparado ao WT ZL no período de 21 dias, logo mostrando a ação e impacto do bifosfonato nitrogenado sob a osteoclastogênese. O efeito primário dos bifosfonatos é causar a apoptose dos osteoclastos (QAYOOM *et al.*, 2018), afetando diretamente a atividade mononuclear, que é a célula de origem dos osteoclastos, interrompendo sua diferenciação e reabsorção óssea, conseqüentemente aumentando o nível de apoptoses osteoclásticas. (CHENG *et al.*, 2009).

Em relação aos parâmetros morfológicos, os grupos WT ZL e 5LOKO ZL apresentaram maior espaçamento de trabéculas ósseas (Tb.Sp) e que em contrapartida, a espessura trabecular (Tb.Th) dos grupos Controles (WT e 5LOKO) foram maiores do que em relação aos grupos ZL. Ao analisar o número de trabéculas (Tb.N), não houveram diferenças significantes estatisticamente, apenas de que o grupo 5LOKO ZL apresentou menor quantidade quando comparado ao seu Controle ($p < 0,09$).

Na análise qualitativa, observou-se que o grupo WT ZL teve menor quantidade de tecido ósseo mineralizado, sendo hipomineralizado e indicando um atraso no reparo alveolar enquanto que o grupo 5LOKO ZL apresentou um reparo acelerado e maior quantidade de tecido ósseo mineralizado.

Ao interpretarmos e analisarmos todos os dados do projeto, verificou-se de que o ZL afetou de forma mais significativa o grupo WT, como mostrado nas imagens por microCT, havendo presença de uma fratura patológica, menor mineralização óssea localizada na periferia dos alvéolos e atraso no reparo, enquanto que o grupo 5LOKO mesmo que prejudicado, ainda apresentou uma certa

resistência, com presença de neoformação óssea no interior dos alvéolos, sem constatação de fratura patológica e presença de um reparo ósseo acelerado, como já demonstrado por Manigrasso e O' Connor (2010), porém em camundongos com fratura em ossos longos, como o fêmur (ossificação endocondral).

Logo, foi de extrema importância utilizar esse tipo de linhagem de camundongo, sexo e idade, uma vez que o objetivo do projeto foi assemelhar-se com as situações que são mais vistas em ambiente clínico: mulheres, idosas, que fazem uso de medicamentos, principalmente para reposição óssea (como os bifosfonatos nitrogenados) e que necessitam de tratamento cirúrgico (extrações dentárias). Outro fator também oportuno, fora de que há inúmeros estudos na literatura sobre os fatores de riscos do uso de bifosfonatos, porém com outras linhagens e camundongos machos, não condizendo com a maior parte da situação clínica que é vivenciada no cotidiano odontológico.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que camundongos fêmeas senescentes adaptadas à inibição da enzima 5LO, apesar do fenótipo esquelético osteopetrótico, apresentam maior resistência à ação do ZL que os animais WT, abrindo caminho para futuras investigações sobre a ação dos leucotrienos no reparo ósseo intramembranoso.

REFERÊNCIAS

- BIGUETTI, C. C. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. **PLoS One**, San Francisco, v. 1804, 10 ago. 2018. Frontiers Media SA. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01804>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30147688/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- CHENG, A. *et al.* Alveolar bone and the bisphosphonates. **Australian Dental Journal**, Sydney, v. 54, n. S1, p. S51-S61, set. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01143.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1834-7819.2009.01143.x>. Acesso em: 11 nov. 2020.
- COLLET, A. R.; STEWART, A. G. Eicosanoids: Physiology update and orthodontic implications. **Australian Orthodontic Journal**, Brisbane, v. 12, n. 2, p. 116-123, out. 1991. Disponível em: <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=019563064046707;res=IE LHEA>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- FLYNN, M. A. *et al.* Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B4. **Calcified Tissue International**, Berlim, v. 64, n. 2, p. 154-159, mai. 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002239900595>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002239900595>. Acesso em: 11 nov. 2020.
- GALLWITZ, W. E. *et al.* 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 268, n. 14, p. 10087-10094, mai. 1993. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/268/14/10087.full.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- GOYTIA, R. N.; SALAMA, A.; KHANUJA, H. S. Bisphosphonates and Osteonecrosis: potential treatment or serious complication? **Orthopedic Clinics Of North America**, Filadélfia, v. 40, n. 2, p. 223-234, abr. 2009. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ocl.2008.12.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0030589808001016>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- HIKIJ, H. *et al.* The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Progress In Lipid Research**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 107-126, mar. 2008. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2007.12.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163782707000550>. Acesso em: 11 nov. 2020.

MANIGRASSO, M. B.; O'CONNOR, J. P. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. **Acta Orthopaedica**, Basingstoke, v.81, n.6, p. 748-755, 11 nov. 2010. Informa UK Limited. DOI:

<http://dx.doi.org/10.3109/17453674.2010.533931>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21067431/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

MASHIBA, T. *et al.* The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. **Journal Of Bone And Mineral Metabolism**, Tóquio, v. 23, n. 1, p. 36-42, jan. 2005. Springer Science and Business Media LLC. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1007/bf03026321>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15984412/>. Acesso em: 11 nov. 2020.

MOURA, A. P. **O papel dos metabólitos da via 5-lipoxigenase na remodelação óssea induzida por força mecânica**. 2013. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013. Disponível em: [http:// https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9QJFWW/1/tese_adriana_moura__1_.pdf](http://https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9QJFWW/1/tese_adriana_moura__1_.pdf). Acesso em: 10 nov. 2020.

ODVINA, C. V. *et al.* Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 1294-1301, mar. 2005. The Endocrine Society. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0952>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15598694/>. Acesso em: 11 nov. 2020.

QAYOOM, I. *et al.* Anabolic and antiresorptive actions of locally delivered bisphosphonates for bone repair. **Bone Joint Res**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 548-560, out. 2018. Published online 2018 Nov 3. DOI: <http://dx.doi.org/10.1302/2046-3758.710.BJR-2018-0015.R2>. Disponível em:

<https://online.boneandjoint.org.uk/doi/epub/10.1302/2046-3758.710.BJR-2018-0015.R2>. Acesso em: 11 nov. 2020.

RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, Filadélfia, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, out. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278239114004637>. Acesso em: 10 nov. 2020.

WOO, S.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Systematic Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. **Annals of Internal Medicine**, Filadélfia, v. 144, n. 10, p. 753-761, 16 maio 2006. American College of Physicians. DOI:

<http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00009>. Disponível em:

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.689.6872&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 11 nov. 2020.