

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia**

**Gabriel Antônio dos Anjos Tou**

**PAPEL DOS RECEPTORES CCR1 NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR  
EM MODELO DE OSTEOPOROSE**

**Belo Horizonte**  
**2024**

Gabriel Antônio dos Anjos Tou

**PAPEL DOS RECEPTORES CCR1 NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR  
EM MODELO DE OSTEOPOROSE**

Monografia apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para conclusão de curso à obtenção do título de Especialista em Ortodontia.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Soraia Macari

Belo Horizonte  
2024

## Ficha Catalográfica

T722p Tou, Gabriel Antônio dos Anjos.  
2024 Papel dos receptores CCR1 na perda óssea alveolar em  
MP modelo de osteoporose / Gabriel Antônio dos Anjos Tou. --  
2024.

31 f. : il.

Orientadora: Soraia Macari.

Monografia (Especialização) -- Universidade Federal de  
Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Estrogênios. 2. Perda do osso alveolar. 3. Receptores  
CCR1. 4. Técnicas de movimentação dentária. 5. Remodelação  
óssea. I. Macari, Soraia. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Odontologia

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha



Ata da Comissão Examinadora para julgamento de Monografia do aluno **GABRIEL ANTÔNIO DOS ANJOS TOU**, do Curso de Especialização em ORTODONTIA, realizado no período de 13/10/2021 a 31/08/2024.

Aos 31 dias do mês de agosto de 2024, às 08:00 horas, no auditório da Ortodonte - Avenida do Contorno, 7197 - Lourdes - Belo Horizonte - MG, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Profa. Soraia Macari (orientadora), Profa. Mariana de Souza Santos e Profa. Sicília Rezende Oliveira. Em sessão pública foram iniciados os trabalhos relativos à Apresentação da Monografia intitulada "**Papel dos receptores CCR1 na perda óssea alveolar em modelo de osteoporose**". Terminadas as arguições, passou-se à apuração final. A nota obtida pelo aluno foi 100 pontos (cem pontos) pontos, e a Comissão Examinadora decidiu pela sua APROVADO. Para constar, eu, Profa. Soraia Macari, Presidente da Comissão, lavrei a presente ata que assino, juntamente com os outros membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 31 de agosto de 2024.

Documento assinado digitalmente



SORAIA MACARI

Data: 02/09/2024 12:28:18-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Soraia Macari Orientador

Profa. Mariana de Souza Santos

Profa.

Sicília Rezende Oliveira

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Leniana Neves pela instrução, orientação, dedicação e comprometimento.

Ao Prof. Dr Rodrigo Cançado pela instrução, orientação, dedicação e comprometimento.

À Profa. Dra. Soraia Macari por contribuir mais uma vez na minha formação através da orientação nesse trabalho.

Aos demais professores da pós-graduação em Ortodontia Esdras França, Leonardo Foresti, Alexandre Drumond, Marcelo Queiroga, Daniel Guimarães e Guilherme Garcia pela instrução, orientação e incentivo.

À chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da FO-UFMG, Profa. Dra. Juliana Vilela e toda sua equipe.

À Faculdade de Odontologia (FO) da UFMG na pessoa do diretor, Prof. Dr. João Novaes.

Ao Colegiado de Pós-Graduação da FO-UFMG na pessoa do coordenador, Prof. Dr. Mauro de Abreu e toda equipe do colegiado.

Aos amigos de turma pelos momentos que vivemos juntos Keila, Patrícia, Raissa, Gabriela, Raquel, Glenda, Lucas, Isabely.

À minha amada Izabela que sempre me apoiou e esteve ao meu lado durante todo esse processo.

À minha família e amigos meu agradecimento especial.

## RESUMO

O papel do estrogênio no metabolismo/remodelação óssea está bem estabelecido nos ossos longos, porém ainda não está claro seu efeito no osso alveolar. O objetivo do estudo foi avaliar papel dos receptores CCR1 na perda óssea alveolar em modelo de osteoporose. Camundongos C57BL6/J com deficiência dos receptores CCR1 e camundongos C57BL6/J tratados com met-RANTES foram ovariectomizados. Camundongos com ovários intactos foram usados como controle. Conforme determinado pela análise MicroCT e análise histomorfométrica do osso alveolar maxilar, ambos os camundongos C57BL6/J apresentaram diminuição da espessura trabecular, densidade óssea e volume ósseo, e aumento da separação trabecular após a ovariectomia. Esses efeitos foram associados à redução da porcentagem de osso trabecular e da espessura cortical no fêmur. Uma perda significativa da crista óssea alveolar também foi associada à ovariectomia em ambas as linhagens de camundongos. Concluindo, a deficiência do receptor CCR1 e o tratamento com met-RANTES diminui a qualidade óssea, entretanto a deficiência de estrogênio piora todos os parâmetros de saúde óssea nesses animais gerando perda óssea alveolar maxilar.

Palavras-chave: estrogênio; perda óssea alveolar; CCR1; movimentação dentária ortodôntica; remodelação óssea.

## **ABSTRACT**

### **Role of CCR1 receptors in alveolar bone loss in an osteoporosis model.**

The role of estrogen in bone metabolism/remodeling is well established in long bones, but its effect on alveolar bone is still unclear. The aim of the study was to determine the effect of estrogen deficiency on alveolar bone microarchitecture. C57BL6/J mice deficient in CCR1 receptors and C57BL6/J mice treated with met-RANTES were ovariectomized. Mice with intact ovaries were used as controls. As determined by MicroCT analysis and histomorphometric analysis of maxillary alveolar bone, both C57BL6/J mice showed decreased trabecular thickness, bone density, and bone volume, and increased trabecular separation after ovariectomy. These effects were associated with a reduction in the percentage of trabecular bone and cortical thickness in the femur. Significant loss of alveolar bone crest was also associated with ovariectomy in both strains of mice. In conclusion, CCR1 receptor deficiency and treatment with met-RANTES decrease bone quality, however, estrogen deficiency worsens all bone health parameters in these animals, generating maxillary alveolar bone loss.

Keywords: estrogens; alveolar bone loss; CCR1; bone remodeling, orthodontic tooth movement.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Parâmetros ósseos analisados através de microCT em camundongos controle ou ovariectomizados (OVX) e tratados com veículo (V) ou metRantes (MR).....	18
Figura 2 - Análise da perda da crista óssea alveolar (área entre crista óssea alveolar e junção cimento esmalte – ABC-CEJ) em imagens tridimensionais.....	19
Figura 3 - Quantificação da movimentação dentária realizada pelo aparelho ortodôntico em camundongos controle ou ovariectomizados (OVX) e tratados com veículo (V) ou metRantes (MR).....	20
Figura 4 - Análise histomorfométrica.....	21
Figura 5 - Movimentação dentária em camundongos transgênicos com ausência do receptor da via CCR1.....	22

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1 O Movimento Dentário.....	10
2.2 Eixo quimiocinas/CCR1.....	11
2.3 Estrogênio.....	12
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	14
3.1 Objetivo geral.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
4.1 Animais.....	15
4.2 Ovariectomia.....	15
4.3 Movimentação dentária.....	15
4.4 Primeiro Experimento.....	15
4.5 Segundo Experimento.....	16
4.6 Micro CT.....	16
4.7 Análise Histomorfométrica.....	16
4.8 Análise Estatística.....	17
<b>5. RESULTADOS</b> .....	18
5.1 Primeiro experimento.....	18
5.1.1 Movimentação ortodôntica.....	19
5.2 Segundo experimento.....	20
5.2.1 Movimentação ortodôntica.....	21
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo dinâmico regulado por mediadores inflamatórios endógenos, como prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (BOYCE; XING, 2008; WISE; KING, 2008). As quimiocinas pertencem à família de citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (ALLEN; CROWN; HANDEL, 2007; SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008). Essas moléculas geram sinais que interagem com os osteoblastos e participam no recrutamento de osteoclastos (YANO; MENTAVERRI; KANUPARTHI; BANDYOPADHYAY, 2005). O papel das quimiocinas da família CC tem sido estudado nos processos de remodelação óssea maxilar, bem como os efeitos de sua ação em doenças sistêmicas (ANDRADE; SILVA; TEIXEIRA *et al.*, 2007; YANO; MENTAVERRI; KANUPARTHI; BANDYOPADHYAY, 2005).

Alguns estudos indicam que CCL3 e CCL5 estão diretamente ligadas ao recrutamento e diferenciação de osteoclastos no osso da mandíbula. Ambas as moléculas interagem com receptores específicos, como CCR1 e CCR5, que são expressos em osteoblastos e osteoclastos (LEE; SHIN; VAN PHAN *et al.*, 2007; YANO; MENTAVERRI; KANUPARTHI; BANDYOPADHYAY, 2005). Portanto, a função desses receptores e a interação com outros componentes na remodelação óssea têm sido alvo de pesquisas recentes.

Outro fator analisado na homeostase óssea é o estrogênio. Baixos níveis desse hormônio resultam em perda óssea trabecular e cortical com uma alta taxa de remodelação óssea. Esses achados têm sido associados à osteoporose no fêmur, corpos vertebrais e osso da mandíbula (MACARI; AJAY SHARMA; WYATT; KNOWLES *et al.*, 2016; MACARI; DUFFLES; QUEIROZ-JUNIOR; MADEIRA *et al.*, 2015). No nível celular, o estrogênio é capaz de alterar a produção de citocinas produzidas por osteoblastos e osteoclastos. A deficiência de estrogênio resulta em perda óssea, principalmente através da regulação positiva da osteoclastogênese por meio do aumento da produção do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 e interleucina-6 (IL-6) (RODY; KING; GU, 2001). O estrogênio também inibe a indução de RANKL e a diferenciação osteoclástica (CHEN; OUYANG; YE; NI *et al.*, 2014).

Outro efeito estrogênico contra a perda óssea é a regulação positiva da secreção de osteoprotegerina (OPG) por osteoblastos e células estromais da medula óssea. Além disso, o estrogênio inibe a reabsorção óssea por meio da regulação positiva de interleucina-10 (IL-10) e semaforina 3A (Sema3A) (HAYASHI;

NAKASHIMA; TANIGUCHI; KODAMA *et al.*, 2012). Embora existam muitos estudos avaliando a interação do estrogênio com outros mediadores inflamatórios, há poucos estudos avaliando a relação entre esse hormônio e os receptores CCR1 e a interação de suas funções na remodelação óssea.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O movimento dentário:

O movimento dentário ortodôntico ocorre pela remodelação do osso alveolar em resposta à cargas mecânicas. Duas áreas distintas se formam no ligamento periodontal em resposta a essa carga, área de compressão e de tensão. Na área de compressão, a raiz dentária é deslocada contra o osso alveolar, comprimindo o ligamento periodontal. Nesta região ocorre reabsorção óssea por osteoclastos e o deslocamento dentário ocorre em direção ao osso reabsorvido. Na área de tensão uma força é aplicada nas fibras do ligamento periodontal e a formação óssea é realizada nesse local por osteoblastos (CATTANEO *et al.*, 2005; KRISHNAN E DAVIDOVITCH, 2006; KRISHNAN E DAVIDOVITCH, 2009; WISE E KING, 2008).

Em virtude da compressão dos vasos sanguíneos das fibras periodontais, ocorre hipóxia das células, seguido pela formação de um processo inflamatório agudo e no desenvolvimento de uma área acelular denominada área de hialinização (ANDRADE JR. *et al.*, 2007; KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; WISE e KING, 2008). O estresse mecânico das células da matriz extracelular dos tecidos periodontais, é transmitido de forma direta da força mecânica para o núcleo da célula através do citoesqueleto (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2009). Esta sinalização intracelular leva à ativação de genes específicos e a produção e liberação de várias citocinas como, prostaglandina E2 (PGE2), neuropeptídeos e substância P interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) para o meio extracelular (DAVIDOVITCH, 2006; MASELLA e MEISTER, 2006). Estas citocinas interagem com as células periodontais e promovem dilatação dos vasos sanguíneos e a migração dos leucócitos para o espaço extravascular, iniciando a formação de um infiltrado inflamatório agudo. Após um ou dois dias da aplicação de forças, ocorre a eliminação do tecido hialinizado, a fase aguda inflamatória diminui e é substituída por um processo inflamatório crônico (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; WISE e KING, 2008).

Após a migração para o tecido periodontal os leucócitos sintetizam e liberam moléculas que estão envolvidas no processo de reabsorção óssea (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento) (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2009; MASELLA e MEISTER, 2006). As interações celulares com estas substâncias desencadeiam o recrutamento de células fagocíticas

como células da linhagem de monócitos/macrófagos e precursores de osteoclastos (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; RODY *et al.*, 2001; WISE e KING, 2008). Estas células sofrem diferenciação em macrófagos e osteoclastos que irão remover o tecido acelular da área do ligamento periodontal comprimido. (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; VON BOHL *et al.*, 2004).

Na área de tensão, os osteoblastos são reponsáveis pela deposição óssea. (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; WISE e KING, 2008). A alteração no fluxo dos canais e canalículos ósseos, causadas pela força de tensão induzem os osteoblastos locais a desempenharem sua função (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2009). Outro fator responsável por essa formação óssea é o estiramento das células periodontais, que estimulam a replicação celular e a produção de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento específicos para recrutamento e diferenciação dos osteoblastos (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006).

## 2.2 Eixo quimiocinas/CCR1:

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular que pertencem à grande família de citocinas quimiotáticas (SCHALL e PROUDFOOT, 2011; YADAV *et al.*, 2010). Estas moléculas são subdivididas em quatro subfamílias: C, CC, CXC e CX3C e são nomeadas de acordo com a família de seus ligantes, e as duas principais subfamílias são CCR ou CXCR (YADAV *et al.*, 2010; ZLOTNIK e YOSHIE, 2000). A maioria das quimiocinas da família CC interagem com diferentes receptores de quimiocina (CCR1, CCR2, CCR5), além disso, um mesmo receptor pode se ligar a diferentes quimiocinas. Essa interação é responsável pelas diferentes funções exercidas por estas moléculas (SCHALL e PROUDFOOT, 2011; YADAV *et al.*, 2010).

Na remodelação óssea, as quimiocinas controlam o recrutamento, a proliferação, diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos e osteoblastos (LEE *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2004; YANO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2004). Alguns estudos mostraram aumento do nível de quimiocinas, tais como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL12, na movimentação dentária ortodôntica em modelo animal e em humanos (ALHASHIMI *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2009; GARLET *et al.*, 2008).

Osteoclastos e osteoblastos expressam os receptores CCR1 e CCR5, além de produzir níveis elevados de CCL3 e CCL5 quando estimulados por IL-1 e TNF- $\alpha$

(YANO *et al.*, 2005). A liberação destas quimiocinas pelos osteoblastos, contribui significativamente para o recrutamento e desenvolvimento dos osteoclastos no sítio de osteólise, exacerbando a perda óssea (YANO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2004;). A CCL3 também está envolvida de forma indireta na diferenciação do osteoclasto, uma vez que é capaz de estimular o aumento da expressão de RANKL pelo osteoblasto e induzir a interação entre o osteoclasto e o osteoblasto (TSUBAKI *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2004).

A interação quimiocinas/CCR1 e sua ação na reabsorção óssea tem sido foco de pesquisas em doenças crônicas inflamatórias. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o receptor CCR1 está envolvido na patogênese de doenças inflamatórias como mieloma múltiplo e artrite reumatoide (MENU; DE LEENHEER; DE RAEVE; COULTON *et al.*, 2006; SHAHRARA; PROUDFOOT; WOODS; RUTH *et al.*, 2005; VALLET; RAJE; ISHITSUKA; HIDESHIMA *et al.*, 2007). O bloqueio ou ausência de CCR1 resulta em redução da osteólise nos estudos que investigam a ação da interação interleucinas/CCR1 nessas doenças (FERREIRA; REPEKE; RAIMUNDO; NUNES *et al.*, 2011; MENU; DE LEENHEER; DE RAEVE; COULTON *et al.*, 2006; OBA; REPEKE; FERREIRA; CLAUDINO; SILVEIRA *et al.*, 2010; SHAHRARA; PROUDFOOT; WOODS; VALLET; RAJE; ISHITSUKA; HIDESHIMA, 2007). Sendo assim, compreender e caracterizar a função e ação dessa via no processo de remodelação óssea se torna importante.

### 2.3 Estrogênio:

O estrogênio é um hormônio esteroidal, sintetizado à partir de andrógenos por meio da enzima aromatase. Esse nome é dado a um grupo de hormônios que são o 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3) e estrona (E1), sendo que o estradiol é o mais potente e está presente na adolescência e em toda fase reprodutiva da mulher (FANG *et al.*, 2001). O estrogênio liberado na corrente sanguínea entra de forma passiva nas células e se liga a seus receptores denominados receptor de estrogênio alfa e beta (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ). Estes receptores se translocam para o núcleo e funcionam como fatores de transcrição (KRUM, 2011; SYED *et al.*, 2005; WEITZMANN e PACIFICI, 2006).

Ao se ligar a seus receptores o estrogênio estimula a osteogênese e inibe a apoptose de osteoblastos permitindo a sobrevivência dessas células e estimulando a apoptose de osteoclastos, dessa forma, ocorre mais formação óssea do que

reabsorção (QU *et al.*, 1998). Além disso, a atividade de reabsorção óssea de osteoclastos maduros também é inibida pelo estrogênio (PARIKKA *et al.*, 2005).

Embora os efeitos do estrogênio sobre as células ósseas estejam bem estabelecidos, sua ação não está completamente esclarecida. A inibição da osteoclastogênese é o principal mecanismo da prevenção de perda óssea através do estrogênio (MANOLAGAS *et al.*, 1993; MANOLAGAS; JILKA, 1995; NAKAMURA *et al.*, 2007; PACIFICI, 1998). Estudos têm demonstrado maior produção de osteoclastos diante a deficiência de estrogênio (WEITZMANN; PACIFICI, 2006). Outro mecanismo que explica os efeitos antiosteoclastogênicos do estrogênio inclui a capacidade dos hormônios esteroidais estimularem a produção de OPG (HOFBAUER *et al.*, 1999).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

O objetivo do estudo foi avaliar papel dos receptores CCR1 na perda óssea alveolar em modelo de osteoporose.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os parâmetros de saúde óssea em camundongos com bloqueio da via CCR em animais tratados com fármaco Met-Rantes em modelo de osteoporose.

- Avaliar os parâmetros de saúde óssea em camundongos transgênicos com ausência do receptor da via CCR1 com deficiência de estrogênio (modelo clássico para osteoporose).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais:

Vinte camundongos fêmeas C57BL6/J tratados ou não com met-RANTES (n=5 por grupo) foram utilizados no primeiro experimento. No segundo experimento, foram utilizadas quinze camundongos fêmeas C57BL6/J e quinze camundongos fêmeas deficientes no receptor CCR1 (CCR1<sup>-/-</sup>). Os animais foram mantidos sob ciclo de luz (12h luz/12h escuro) e temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais da Universidade de Minas Gerais (protocolo 39/2011).

### 4.2 Ovariectomia:

Os camundongos dos grupos experimentais foram ovariectomizados bilateralmente. Esfregaços vaginais foram rotineiramente utilizados para monitorar a progressão do ciclo estral.

### 4.3 Movimentação dentária:

A indução da movimentação dentária foi realizada conforme estudos anteriores (ANDRADE *et al.*, 2009; TADDEI *et al.*, 2013). Uma mola de Ni-Ti de 0,25x0,76mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, EUA) foi fixada entre o primeiro molar superior direito e os incisivos de cada camundongo, exercendo uma força de 0,35N na direção mesial. Não houve reativação durante o período experimental. O lado esquerdo foi utilizado como controle.

### 4.4 Primeiro Experimento:

No primeiro experimento, os camundongos foram divididos em grupos: camundongos controle tratados com veículo; camundongos controle tratados com met-RANTES, administração s.c. 0,5 mg/Kg/dia; animais OVX tratados com met-RANTES (OVX+met-RANTES); animais OVX tratados com veículo (PBS), administração s.c. 0,5mg/Kg/dia (OVX+veículo). A mola ortodôntica foi instalada dezoito dias após a OVX. Os animais foram eutanasiados por decapitação trinta dias após a ovariectomia. Os camundongos controle foram eutanasiados após dois ciclos estrais regulares e consecutivos. Maxila e fêmur foram coletados para análise por MicroCT.

#### 4.5 Segundo Experimento:

No segundo experimento, os camundongos foram divididos em grupos: controle WT (sem ovariectomia), WT OVX, , controle CCR1-/-, CCR1-/- OVX. A mola ortodôntica foi instalada dezoito dias após a OVX. Os animais foram eutanasiados por decapitação trinta dias após a ovariectomia. Os camundongos controle foram eutanasiados após dois ciclos estrais regulares e consecutivos. Útero, maxila e fêmur foram coletados para análise. O peso uterino foi determinado e a maxila e o fêmur foram submetidos à análise histomorfométrica.

#### 4.6 MicroCT:

Conforme descrito anteriormente por Macari *et al.* (2015), os ossos alveolares maxilares e os fêmures foram escaneados usando um sistema de microCT (microtomógrafo de Raio-X Skyscan 1176, Aartselaar, Bélgica) e software CT-Analyser (Skyscan, Bélgica). Foram adquiridas imagens de alta resolução com um tamanho de voxel isotrópico de 18  $\mu\text{m}$  (50kV, filtro de alumínio de 0.5mm, ângulo de rotação de 0.5°). A área de furca da raiz do primeiro molar e os fêmures foram analisados para determinar a espessura trabecular (Tb.Th), a separação trabecular (Tb.Sp), a densidade mineral óssea (BMD), o volume ósseo (BV) e a porcentagem de volume ósseo/volume total (BV/TV%). A altura da crista óssea alveolar (ABC) foi determinada pela análise da área entre a junção cimento-esmalte (CEJ) e a ABC (CEJ-ABC) em imagens tridimensionais (Fiji - National Institutes of Health, EUA) dos primeiros, segundos e terceiros molares (Bonnet *et al.*, 2013).

#### 4.7 Análises histomorfométricas:

Para a coloração com hematoxilina e eosina, os fêmures e a maxila foram fixados em formalina a 10%, descalcificados em EDTA a 14% e incorporados em parafina. Secções sagitais de 5 $\mu\text{m}$  foram coradas com hematoxilina e eosina. O BV/TV% da epífise proximal e metafise do fêmur foram determinados utilizando um ocular contendo uma grade de 25 pontos (Zeiss KLP 10x) a 40x de amplificação (Ocarino *et al.*, 2007). O movimento dentário foi obtido pela diferença entre a distância da junção cimento-esmalte do primeiro molar e o segundo molar do lado experimental em relação ao lado controle do mesmo animal. Cinco secções por animal foram avaliadas sob um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Gottingen, Niedersachsen,

Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A 620, Canon, Tóquio, Japão). Para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), a maxila foi fixada em formalina a 10%, descalcificada em EDTA a 14% e incorporada em parafina. Secções sagitais de 5µm foram coradas por TRAP e o lado mesial da raiz disto-palatina do primeiro molar foi usado para a contagem de osteoclastos TRAP positivos, em cinco secções por animal.

Para a coloração de Von Kossa, os fêmures foram fixados em formaldeído a 10%, desidratados e incorporados em resina (Technovit 7200, Exakt, Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha). Os blocos foram cortados no plano sagital, corados por Von Kossa, e a metafise proximal foi fotografada a 5x de ampliação e a diáfise a 10x de ampliação sob um microscópio de luz conectado a uma câmera digital (PowerShot A 620, Canon, Tóquio, Japão). O BV/TV% e a espessura do osso cortical (Cs.Th) foram medidos usando o software Image J (National Institutes of Health, EUA).

#### 4.8 Análise estatística:

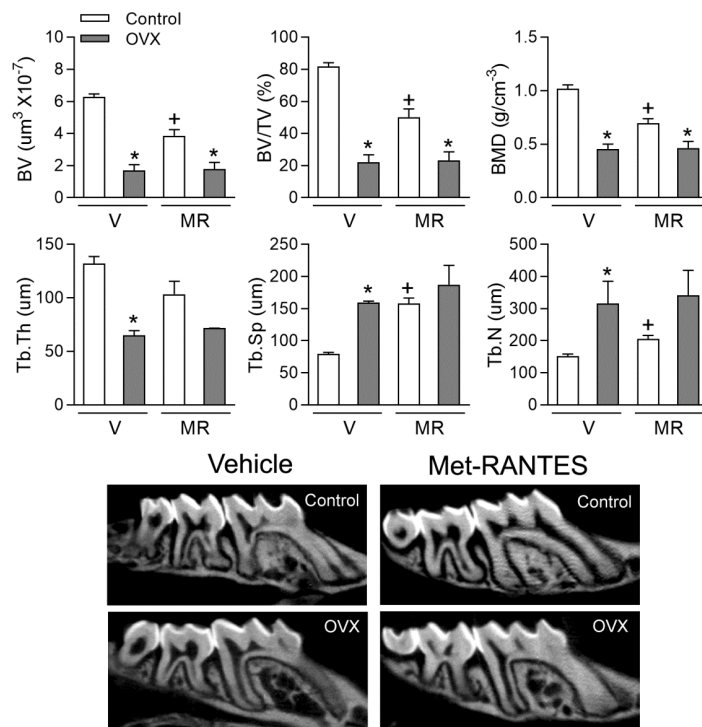
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As diferenças entre grupos foram analisadas por meio de ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls. Um valor de  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Primeiro Experimento:

Conforme determinado pela análise microCT, houve diminuição da qualidade óssea nos animais OVX que receberam o veículo nos parâmetros de BV, BV/TV, DMO e Tb.Th quando comparados ao grupo controle. Os parâmetros Tb.Sp e Tb.N apresentaram aumento nos animais tratados com veículo ( $p < 0,05$ ; Figura 1). Da mesma forma, foi observada diminuição na qualidade óssea em animais OVX previamente tratados com met-RANTES nos parâmetros de BV, BV/TV e BMD. Nesse grupo, os demais parâmetros não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ; Fig. 1). Foram identificadas diferenças significativas no grupo controle ao comparar os animais tratados com met-RANTES com aqueles tratados com o veículo. BV, BV/TV e DMO diminuíram, enquanto Tb.Sp e Tb.N aumentaram ( $p < 0,05$ ; Fig. 1).

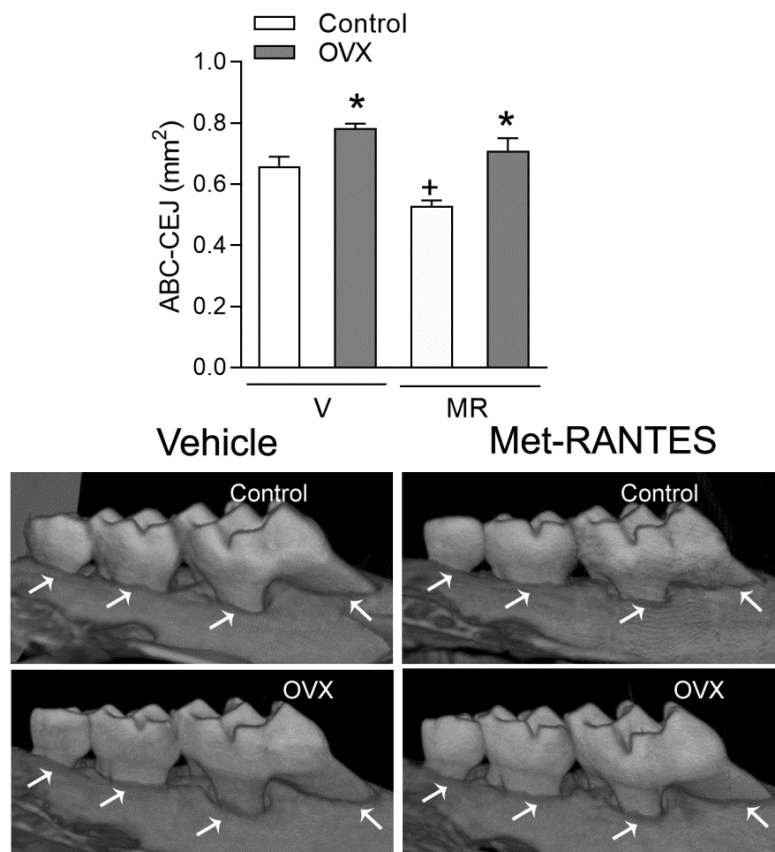
Figura 1- Parâmetros ósseos analisados através de microCT em camundongos controle ou ovariectomizados (OVX) e tratados com veículo (V) ou metRantes (MR).



Legenda: \* Significância ( $p < 0,05$ ) entre OVX e controle. + Significância ( $p < 0,05$ ) entre grupos tratados. BV/TV –volume ósseo /total volume (%), BV – Volume ósseo, BMD- Densidade mineral óssea, Tb.Th – Espessura trabecular, Tb.Sp – Separação trabecular, MR – Met-Rantes, V- Veículo, Control – Intact mice, OVX –ovariectomy mice. Fonte: Do autor, 2024.

A área CEJ-ABC aumentou em animais OVX nos grupos veículo e met-RANTES. Foi identificada diminuição da área no grupo controle ao comparar os animais tratados com Met-RANTES e o veículo ( $p < 0,05$ ; Figura 2).

Figura 2 – Análise da perda da crista óssea alveolar (área entre crista óssea alveolar e junção cimento esmalte – ABC-CEJ) em camundongos controle ou ovariectomizados (OVX) e tratados com veículo (V) ou metRantes (MR). Imagens tridimensionais (Fiji - National Institutes of Health, EUA).



Legenda: \*Significância ( $p < 0,05$ ) entre OVX e controle. + Significância ( $p < 0,05$ ) entre grupos tratados. MR – Met-Rantes, Control – Intact mice, OVX –ovariectomy mice, V- Veículo.

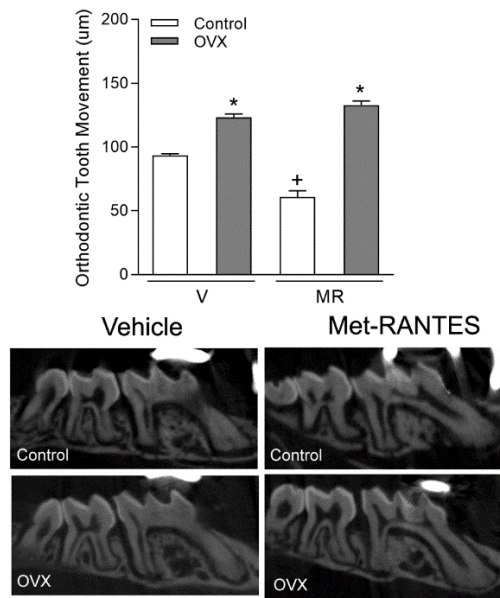
Fonte: Do autor, 2024.

### 5.1.1 Movimentação Ortodôntica:

A movimentação dentária realizada pelo aparelho ortodôntico também foi quantificada nos animais tratados com Met-RANTES. Foi identificado aumento de movimentação nos animais OVX nos grupos tratados com veículo e Met-RANTES comparado ao grupo controle. Além disso, foi identificada uma diminuição na

movimentação dentária no grupo controle de animais tratados com Met-RANTES em comparação ao veículo ( $p < 0,05$ ; Figura 3).

Figura 3 – Quantificação da movimentação dentária realizada pelo aparelho ortodôntico em camundongos controle ou ovariectomizados (OVX) e tratados com veículo (V) ou metRantes (MR).



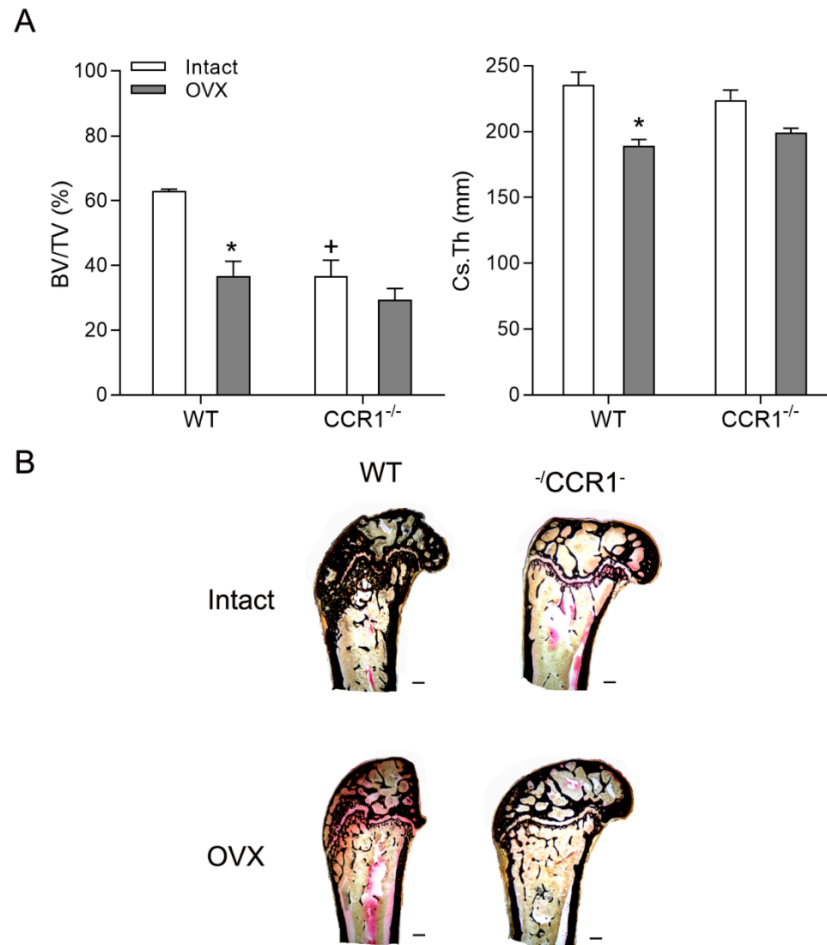
MR – Met-Rantes, Control – Intact mice, OVX – ovariectomy mice, V- Veículo. Significância ( $p < 0,05$ ) entre OVX e controle. + Significância ( $p < 0,05$ ) entre grupos tratados.

Fonte: Do autor, 2024.

## 5.2 Segundo Experimento:

No segundo experimento, a qualidade óssea foi avaliada através de análise histomorfométrica, comparando animais transgênicos (CCR1<sup>-/-</sup>) e animais selvagens (WT) submetidos à ovariectomia. Foi identificada diminuição da qualidade óssea nos animais WT ovariectomizados nos parâmetros BV/TV e Cs.Th quando comparados ao grupo intacto. Da mesma forma, foi identificada a diminuição desses parâmetros no grupo CCR1<sup>-/-</sup>, porém sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ; Figura. 4). A única diferença significativa encontrada entre os grupos WT e CCR1<sup>-/-</sup> foi no BV/TV dos animais intactos ( $p < 0,05$ ; Figura 4).

Figura 4 – Análise histomorfométrica.



Legenda: A) – Representação gráfica da análise histomorfométrica dos parâmetros de qualidade óssea em camundongos transgênicos com ausência do receptor da via CCR1 com deficiência de estrogênio (modelo clássico para osteoporose).

B) Histomorfometria óssea de fêmures de camundongos.

Significância ( $p < 0,05$ ) entre OVX e controle. + Significância ( $p < 0,05$ ) entre grupos tratados. BV/TV – Bone volume/total volume (%), Cs.Th – Cortical thickness, Control – Intact mice, OVX – ovariectomy mice, WT – Wild type mice (C57/BL6), CCR1<sup>-/-</sup> – CCR1 knockout mice.

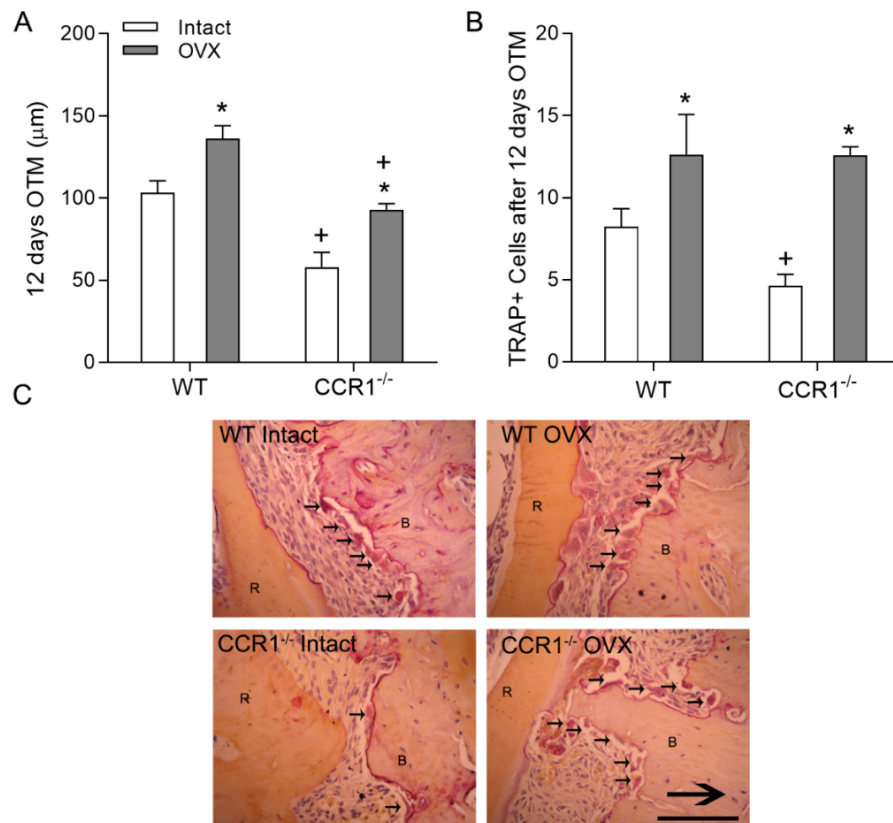
Fonte: Do autor, 2024.

### 5.2.1 Movimentação Ortodôntica:

Outro parâmetro avaliado foi a quantidade de movimento (Figura. 5 A). Maior movimentação dentária foi identificada em animais WT OVX em comparação com animais WT intactos. Da mesma forma, foi identificado um aumento na movimentação dentária em animais CCR1<sup>-/-</sup> OVX em comparação aos animais intactos ( $p < 0,05$ ; Figura 5 A). Os animais CCR1<sup>-/-</sup> OVX e CCR1<sup>-/-</sup> intactos apresentaram menor

movimentação dentária em comparação aos animais WT ( $p < 0,05$ ; Figura. 5 A). O número de células osteoclásticas também foi avaliado (Figura. 5 B). Os animais WT OVX apresentaram maior número de células osteoclásticas em comparação aos animais WT intactos. Da mesma forma, os animais CCR1<sup>-/-</sup> OVX apresentaram maior contagem de osteoclastos do que os intactos. Os animais CCR1<sup>-/-</sup> intactos apresentaram uma contagem de células mais baixa do que os animais WT intactos ( $p < 0,05$ ; Fig. 5 B).

Figura 5 - Movimentação dentária em camundongos transgênicos com ausência do receptor da via CCR1.



Legenda: A)- Representação gráfica da movimentação dentária do segundo experimento em camundongos transgênicos com ausência do receptor da via CCR1 com deficiência de estrogênio (modelo clássico para osteoporose).

B) Representação gráfica da contagem de osteoclastos após a movimentação dentária.

C) Histomorfologia após a movimentação dentária.

Significância ( $p < 0,05$ ) entre OVX e controle. + Significância ( $p < 0,05$ ) entre grupos tratados. Control – Intact mice, OVX – ovariectomy mice, WT – Wild type mice (C57/BL6), CCR1<sup>-/-</sup> – CCR1 knockout mice.

Fonte: Do autor, 2024.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a ausência de estrogênio e sua relação com a via das quimiocinas da família CC e seus receptores nas alterações ósseas. Na literatura, existem estudos que mostram que a estrutura óssea alveolar e femoral de camundongos é significativamente impactada pela falta de estrogênio (MACARI; DUFFLES; QUEIROZ-JUNIOR; MADEIRA *et al.*, 2015) Essa insuficiência está associada a alterações na expressão de citocinas na maxila, o que sugere um possível mecanismo de perda óssea alveolar decorrente da deficiência desse hormônio (MACARI; DUFFLES; QUEIROZ-JUNIOR; MADEIRA *et al.*, 2015). O estrogênio desempenha um papel crucial na saúde óssea, e sua ausência leva ao aumento da deterioração óssea na coluna, quadris e antebraços, aumentando o risco de fraturas (KANIS; COOPER; RIZZOLI; REGINSTER *et al.*, 2020) Em nossa pesquisa, os animais foram submetidos à ovariectomia para induzir deficiência de estrogênio. Na ausência desse hormônio, como observado em animais transgênicos (CCR1-) ovariectomizados, houve acentuada degradação óssea, confirmada pela diminuição de parâmetros como BV/TV% e Cs.Th, o que confirma os achados de Bartell *et al.* (2013) e Bonnet *et al.* (2013)

Além disso, analisamos a estrutura óssea alveolar por micro-TC em animais tratados com Met-Rantes. Os resultados demonstram perda óssea, evidenciada por aumento de Tb.Sp e redução de Tb.Th, DMO, BV e BV/TV. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores (MACARI; DUFFLES; QUEIROZ-JUNIOR; MADEIRA *et al.*, 2015). Liu *et al.* (2015), por exemplo, observaram aumento na Tb.Sp na mandíbula de ratas 24 semanas após OVX, bem como redução de Tb.Th nas semanas 2, 12 e 24 após ovariectomia.

Neste estudo, realizamos movimentação dentária por meio de aparelho ortodôntico. Foi encontrado aumento da área ABC-CEJ após movimentação, o que indica maior perda óssea na região molar dos animais OVX tratados com met-Rantes e veículo. Bonnet *et al.* (2013) identificaram que a área ABC-CEJ aumentou 30 dias após OVX. Nossos resultados também corroboram essa elevação, indicando que os ossos alveolares são significativamente afetados pela ausência de estrogênio.

Embora tenhamos utilizado dois modelos experimentais, um grupo tratado com Met-Rantes e um grupo transgênico CCR1, foi possível verificar que ambos apresentaram menor qualidade óssea quando comparados aos respectivos grupos

controle. Além disso, a ovariectomia prejudicou significativamente a qualidade óssea em ambos os grupos experimentais. Esses achados revelam a importância da presença do estrogênio e sua relação com a saúde óssea. Estudos têm demonstrado uma possível correlação entre deficiência de estrogênio e deterioração óssea alveolar (AMADEI; SOUZA; BRANDÃO; ROCHA, 2011). A falta de estrogênio afeta a estrutura óssea alveolar, comprometendo sua resistência mecânica e, conseqüentemente, influenciando a progressão de perda óssea alveolar (AMES; HONG; LEE; FIELDS *et al.*, 2010; ANBINDER; PRADO; BALDUCCI *et al.*, 2007; ESFAHANIAN; SHAMAMI, 2012; MCLEAN, 2009; ORRICO; GIRO; GONÇALVES; TAKAYAMA *et al.*, 2007; SILVA; GARLET; FUKADA; SILVA *et al.*, 2007). Nossos resultados corroboram com esses achados.

Vários mecanismos moleculares estão envolvidos na deterioração óssea na ausência de estrogênio. Estudos destacam o papel de OPG, RANKL e TNF- $\alpha$  na regulação da perda óssea em ossos longos após ovariectomia (AOKI; SAITO; ITZSTEIN; ISHIGURO *et al.*, 2006; ROGGIA; GAO; CENCI; WEITZMANN *et al.*, 2001). Um avanço significativo na deterioração óssea alveolar é observado em pacientes com osteopenia devido a ausência de estrogênio (AOKI; SAITO; ITZSTEIN; ISHIGURO *et al.*, 2006; LAMONTE; HOVEY; GENCO; MILLEN *et al.*, 2013; NICOPOULOU-KARAYIANNI; TZOUTZOUKOS; MITSEA; KARAYIANNIS *et al.*, 2009; YOSHIHARA; SEIDA; HANADA; MIYAZAKI, 2004). Nossos achados indicam que a redução dos parâmetros ósseos na mandíbula deve ser investigada meticulosamente, principalmente em pacientes de idade avançada, considerando a possível presença de osteoporose.

Foram realizadas pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos que atuam como antagonistas e agonistas dos receptores de quimiocinas da família CC (CHEN; XU; SONG; ZHANG *et al.*, 2024; GLADUE; BROWN; ZWILLICH, 2010; KARASH; MAZZONI; GILCHRIST, 2014; PEASE; HORUK, 2005). A produção inadvertida ou excessiva dessas quimiocinas tem sido associada à vários processos de doenças crônicas inflamatórias, como artrite reumatóide, esclerose múltipla e doença pulmonar obstrutiva crônica (GLADUE; BROWN; ZWILLICH, 2010; PEASE; HORUK, 2005). Portanto, esforços têm sido feitos para caracterizar as interações quimiocina/receptor com o objetivo final de intervenção terapêutica. Normalmente, esses tipos de doenças inflamatórias crônicas estão associados à medicação contínua, portanto, estudos que analisem a inibição do receptor CCR1 são

necessários para elucidar os efeitos adversos causados por essas drogas em intervenções odontológicas. Em nosso estudo foi possível identificar que após a indução da remodelação óssea por meio de aparelho ortodôntico, os parâmetros de análise da qualidade óssea diminuíram nos animais que apresentaram inibição da via CCR1. Mais estudos em humanos sobre o uso de drogas antagonistas do CCR1 são necessários para compreender o comportamento das células osteoclásticas na remodelação óssea induzida por movimentos ortodônticos.

## 7 CONCLUSÃO

A deficiência de estrogênio observada em camundongos submetidos à ovariectomia está associada à deterioração óssea semelhante ao que ocorre durante a menopausa em humanos. Nossos achados, obtidos por meio de micro-TC, sugerem que a falta de estrogênio também resulta em perda óssea alveolar significativa. A deficiência do receptor CCR1 e o tratamento com Met-RANTES diminui a qualidade óssea, entretanto a deficiência de estrogênio piora todos os parâmetros de saúde óssea nos animais gerando perda óssea alveolar maxilar. Portanto, mais pesquisas são necessárias para investigar se as diversas vias de citocinas que influenciam a deterioração óssea durante a queda de produção de estrogênio, como na menopausa, são alvos eficazes para prevenir este tipo de perda óssea.

## REFERÊNCIAS

- ALHASHIMI, N.; FRITHIOF, L.; BRUDVIK, P.; BAKHIET, M. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. **J Interferon Cytokine Res**, 19, n. 9, p. 1047-1052, Sep 1999.
- ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu Rev Immunol**, 25, p. 787-820, 2007.
- AMADEI, S. U.; SOUZA, D. M.; BRANDÃO, A. A.; ROCHA, R. F. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. **Braz Oral Res**, 25, n. 6, p. 538-543, 2011.
- AMES, M. S.; HONG, S.; LEE, H. R.; FIELDS, H. W. *et al.* Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. **Arch Oral Biol**, 55, n. 8, p. 599-605, Aug 2010.
- ANBINDER, A. L.; PRADO, F. E. A.; PRADO, M. E. A.; BALDUCCI, I. *et al.* The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. **Braz Oral Res**, 21, n. 3, p. 247-252, 2007.
- ANDRADE, I.; SILVA, T. A.; SILVA, G. A.; TEIXEIRA, A. L. *et al.* The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, 86, n. 11, p. 1089-1094, Nov 2007.
- ANDRADE, I.; TADDEI, S. R.; GARLET, G. P.; GARLET, T. P. *et al.* CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, 88, n. 11, p. 1037-1041, Nov 2009.
- AOKI, K.; SAITO, H.; ITZSTEIN, C.; ISHIGURO, M. *et al.* A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. **J Clin Invest**, 116, n. 6, p. 1525-1534, Jun 2006.
- BARTELL, S. M.; HAN, L.; KIM, H. N.; KIM, S. H. *et al.* Non-nuclear-initiated actions of the estrogen receptor protect cortical bone mass. **Mol Endocrinol**, 27, n. 4, p. 649-656, Apr 2013.
- BONNET, N.; LESCLOUS, P.; SAFFAR, J. L.; FERRARI, S. Zoledronate effects on systemic and jaw osteopenias in ovariectomized periostin-deficient mice. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e58726, 2013.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys**, 473, n. 2, p. 139-146, May 15 2008.
- CATTANEO, P. M.; DALSTRA, M.; MELSEN, B. The finite element method: a tool to study orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, 84, n. 5, p. 428-433, May 2005.

CHEN, F.; OUYANG, Y.; YE, T.; NI, B. *et al.* Estrogen inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation by increasing the expression of TRPV5 channel. **J Cell Biochem**, 115, n. 4, p. 651-658, Apr 2014.

CHEN, L.; XU, G.; SONG, X.; ZHANG, L. *et al.* A novel antagonist of the CCL5/CCR5 axis suppresses the tumor growth and metastasis of triple-negative breast cancer by CCR5-YAP1 regulation. **Cancer Lett**, 583, p. 216635, Feb 28 2024.

ESFAHANIAN, V.; SHAMAMI, M. S. Relationship between osteoporosis and periodontal disease: review of the literature. **J Dent (Tehran)**, 9, n. 4, p. 256-264, 2012.

FERREIRA, S. B.; REPEKE, C. E.; RAIMUNDO, F. M.; NUNES, I. S. *et al.* CCR5 mediates pro-osteoclastic and osteoclastogenic leukocyte chemoattraction. **J Dent Res**, 90, n. 5, p. 632-637, May 2011.

GARLET, T. P.; COELHO, U.; REPEKE, C. E.; SILVA, J. S. *et al.* Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. **Cytokine**, 42, n. 3, p. 330-335, Jun 2008.

GLADUE, R. P.; BROWN, M. F.; ZWILLICH, S. H. CCR1 antagonists: what have we learned from clinical trials. **Curr Top Med Chem**, 10, n. 13, p. 1268-1277, 2010.

HAYASHI, M.; NAKASHIMA, T.; TANIGUCHI, M.; KODAMA, T. *et al.* Osteoprotection by semaphorin 3A. **Nature**, 485, n. 7396, p. 69-74, May 03 2012.

HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C. R.; LACEY, D. L. *et al.* Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. **Endocrinology**, 140, n. 9, p. 4367-4370, Sep 1999.

KANIS, J. A.; COOPER, C.; RIZZOLI, R.; REGINSTER, J. Y. *et al.* Correction to: European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporos Int**, 31, n. 4, p. 801, Apr 2020.

KARASH, A.; MAZZONI, M. R.; GILCHRIST, A. Pharmacological intervention at CCR1 and CCR5 as an approach for cancer: help or hindrance. **Curr Top Med Chem**, 14, n. 13, p. 1553-1573, 2014.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, 129, n. 4, p. 469.e461-432, Apr 2006.

KRUM, S. A. Direct transcriptional targets of sex steroid hormones in bone. **J Cell Biochem**, 112, n. 2, p. 401-408, Feb 2011.

LAMONTE, M. J.; HOVEY, K. M.; GENCO, R. J.; MILLEN, A. E. *et al.* Five-year changes in periodontal disease measures among postmenopausal females: the Buffalo OsteoPerio study. **J Periodontol**, 84, n. 5, p. 572-584, May 2013.

LEE, J. E.; SHIN, H. H.; LEE, E. A.; VAN PHAN, T. *et al.* Stimulation of osteoclastogenesis by enhanced levels of MIP-1alpha in BALB/c mice in vitro. **Exp Hematol**, 35, n. 7, p. 1100-1108, Jul 2007.

LIU, X. L.; LI, C. L.; LU, W. W.; CAI, W. X. *et al.* Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. **Clin Oral Implants Res**, 26, n. 4, p. 392-398, Apr 2015.

MACARI, S.; AJAY SHARMA, L.; WYATT, A.; KNOWLES, P. *et al.* Osteoprotective Effects of Estrogen in the Maxillary Bone Depend on ER $\alpha$ . **J Dent Res**, 95, n. 6, p. 689-696, Jun 2016.

MACARI, S.; DUFFLES, L. F.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MADEIRA, M. F. *et al.* Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. **Arch Oral Biol**, 60, n. 2, p. 333-341, Feb 2015.

MANOLAGAS, S. C.; JILKA, R. L.; GIRASOLE, G.; PASSERI, G. *et al.* Estrogen, cytokines, and the control of osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. **Osteoporos Int**, 3 Suppl 1, p. 114-116, 1993.

MASELLA, R. S.; MEISTER, M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, 129, n. 4, p. 458-468, Apr 2006.

MCLEAN, R. R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**, 7, n. 4, p. 134-139, Dec 2009.

MENU, E.; DE LEENHEER, E.; DE RAEVE, H.; COULTON, L. *et al.* Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: a study in the 5TMM model. **Clin Exp Metastasis**, 23, n. 5-6, p. 291-300, 2006.

NAKAMURA, T.; IMAI, Y.; MATSUMOTO, T.; SATO, S. *et al.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell**, 130, n. 5, p. 811-823, Sep 07 2007.

NICOPOULOU-KARAYIANNI, K.; TZOUTZOUKOS, P.; MITSEA, A.; KARAYIANNIS, A. *et al.* Tooth loss and osteoporosis: the OSTEODENT Study. **J Clin Periodontol**, 36, n. 3, p. 190-197, Mar 2009.

OBA, Y.; LEE, J. W.; EHRLICH, L. A.; CHUNG, H. Y. *et al.* MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. **Exp Hematol**, 33, n. 3, p. 272-278, Mar 2005.

OCARINO, N. M.; MARUBAYASHI, U.; CARDOSO, T. G.; GUIMARAES, C. V. *et al.* Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, 7, n. 1, p. 84-93, 2007.

ORRICO, S. R.; GIRO, G.; GONÇALVES, D.; TAKAYAMA, L. *et al.* Influence of the period after ovariectomy on femoral and mandibular bone density and on induced periodontal disease. **J Periodontol**, 78, n. 1, p. 164-169, Jan 2007.

PACIFICI, R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. **Endocrinology**, 139, n. 6, p. 2659-2661, Jun 1998.

PARIKKA, V.; PENG, Z.; HENTUNEN, T.; RISTELI, J. *et al.* Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor-alpha-deficient male and female mice. **Eur J Endocrinol**, 152, n. 2, p. 301-314, Feb 2005.

PEASE, J. E.; HORUK, R. CCR1 antagonists in clinical development. **Expert Opin Investig Drugs**, 14, n. 7, p. 785-796, Jul 2005.

QU, Q.; PERÄLÄ-HEAPE, M.; KAPANEN, A.; DAHLLUND, J. *et al.* Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. **Bone**, 22, n. 3, p. 201-209, Mar 1998.

REPEKE, C. E.; FERREIRA, S. B.; CLAUDINO, M.; SILVEIRA, E. M. *et al.* Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. **Bone**, 46, n. 4, p. 1122-1130, Apr 2010.

RODY, W. J.; KING, G. J.; GU, G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, 120, n. 5, p. 477-489, Nov 2001.

ROGGIA, C.; GAO, Y.; CENCI, S.; WEITZMANN, M. N. *et al.* Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 24, p. 13960-13965, Nov 20 2001.

SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nat Immunol**, 9, n. 9, p. 949-952, Sep 2008.

SCHALL, T. J.; PROUDFOOT, A. E. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 5, p. 355-363, May 2011.

SHAHRARA, S.; PROUDFOOT, A. E.; WOODS, J. M.; RUTH, J. H. *et al.* Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES. **Arthritis Rheum**, 52, n. 6, p. 1907-1919, Jun 2005.

SILVA, T. A.; GARLET, G. P.; FUKADA, S. Y.; SILVA, J. S. *et al.* Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **J Dent Res**, 86, n. 4, p. 306-319, Apr 2007.

SYED, F. A.; MÖDDER, U. I.; FRASER, D. G.; SPELSBERG, T. C. *et al.* Skeletal effects of estrogen are mediated by opposing actions of classical and nonclassical estrogen receptor pathways. **J Bone Miner Res**, 20, n. 11, p. 1992-2001, Nov 2005.

TADDEI, S. R.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MOURA, A. P.; ANDRADE, I. *et al.* The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice. **Bone**, 52, n. 1, p. 259-267, Jan 2013.

TSUBAKI, M.; KATO, C.; MANNO, M.; OGAKI, M. *et al.* Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) enhances a receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) expression in mouse bone marrow stromal cells and osteoblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways. **Mol Cell Biochem**, 304, n. 1-2, p. 53-60, Oct 2007.

VALLET, S.; RAJE, N.; ISHITSUKA, K.; HIDESHIMA, T. *et al.* MLN3897, a novel CCR1 inhibitor, impairs osteoclastogenesis and inhibits the interaction of multiple myeloma cells and osteoclasts. **Blood**, 110, n. 10, p. 3744-3752, Nov 15 2007.

VON BÖHL, M.; MALTHA, J.; VON DEN HOFF, H.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Changes in the periodontal ligament after experimental tooth movement using high and low continuous forces in beagle dogs. **Angle Orthod**, 74, n. 1, p. 16-25, Feb 2004.

WATANABE, T.; KUKITA, T.; KUKITA, A.; WADA, N. *et al.* Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1alpha: evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL. **J Endocrinol**, 180, n. 1, p. 193-201, Jan 2004.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **J Clin Invest**, 116, n. 5, p. 1186-1194, May 2006.

WISE, G. E.; KING, G. J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, 87, n. 5, p. 414-434, May 2008.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clin Chim Acta**, 411, n. 21-22, p. 1570-1579, Nov 11 2010.

YANO, S.; MENTAVERRI, R.; KANUPARTHI, D.; BANDYOPADHYAY, S. *et al.* Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. **Endocrinology**, 146, n. 5, p. 2324-2335, May 2005.

YOSHIHARA, A.; SEIDA, Y.; HANADA, N.; MIYAZAKI, H. A longitudinal study of the relationship between periodontal disease and bone mineral density in community-dwelling older adults. **J Clin Periodontol**, 31, n. 8, p. 680-684, Aug 2004.

YU, X.; HUANG, Y.; COLLIN-OSDOBY, P.; OSDOBY, P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. **J Bone Miner Res**, 19, n. 12, p. 2065-2077, Dec 2004.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, 12, n. 2, p. 121-127, Feb 2000.