

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

Francine Rafaela Fernandes da Silva

**EFEITO DO TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DO LEITE  
BOVINO NAS ESTRUTURAS MINERALIZADAS DA MAXILA DE  
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

Francine Rafaela Fernandes da Silva

**EFEITO DO TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DO LEITE  
BOVINO NAS ESTRUTURAS MINERALIZADAS DA MAXILA DE  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Nutrição, Alimentação e Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina Chaves de Oliveira.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Soraia Macari.

Belo Horizonte

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586e	<p>Silva, Francine Rafaela Fernandes da. Efeito do tratamento com vesículas extracelulares do leite bovino nas estruturas mineralizadas da maxila de camundongos / Francine Rafaela Fernandes da Silva. – 2021. 74 f. : il.</p> <p>Orientadora: Marina Chaves de Oliveira. Coorientadora: Soraia Macari.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.</p> <p>1. Osteoporose – Teses. 2 Movimentação dentária – Teses. 3. Leite – Teses. 4. Maxilares – Teses. 5. Osteoclastos – Teses. I. Oliveira, Marina Chaves de. II. Macari, Soraia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 612.39</p>
-------	--

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292

# FOLHA DE APROVAÇÃO

04/03/2021

SEI/UFMG - 0598637 - Folha de Aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DO TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DO LEITE BOVINO NAS ESTRUTURAS MINERALIZADAS DA MAXILA DE CAMUNDONGOS

FRANCINE RAFAELA FERNANDES DA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 03 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Marina Chaves de Oliveira (Orientadora e presidente da comissão) - UFMG  
Profa. Dra. Soraia Macari (Coorientadora) - UFMG  
Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva - UFMG  
Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves - USP

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Sandra Yasuyo Fukada Alves, Usuário Externo, em 03/03/2021, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marina Chaves de Oliveira, Professora do Magistério Superior, em 03/03/2021, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Tarcília Aparecida da Silva, Professora do Magistério Superior, em 03/03/2021, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Soraia Macari, Professora do Magistério Superior, em 03/03/2021, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?)

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=618386&infra\\_sistema=1000...](https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=618386&infra_sistema=1000...) 1/2

04/03/2021

SEI/UFMG - 0598637 - Folha de Aprovação



[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador 0598637 e o código CRC 4ACB8AF7.

Referência: Processo nº 23072.208450/2021-33

SEI nº 0598637

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=618386&infra\\_sistema=1000...](https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=618386&infra_sistema=1000...) 2/2

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente a Deus, por ter proporcionado os caminhos e me capacitado para que os desafios fossem enfrentados.

Agradeço minha família pelo apoio incondicional, pela contribuição para meu aprendizado, pelos incentivos e principalmente pela confiança.

Ao grupo Imunometabolismo, agradeço pela oportunidade de compor o grupo, por ter sido bem recebida, pelos ensinamentos, por todo o conhecimento oferecido e pelo apoio. Agradeço, em específico, a professora Marina, pela oportunidade, orientação, confiança e por ter me acolhido como sua aluna de mestrado, mesmo sem previamente termos tido contato. Meus agradecimentos também se estendem a professora Adaliene, que, além de me receber para com o grupo, contribuiu efetivamente para o desenvolvimento do meu projeto. À minha colega de profissão, Poliana, que me ajudou a ingressar no mestrado, assim como acompanhou toda a minha caminhada durante o curso. Às minhas demais colegas, não menos importantes, Amanda, Mariele, Larissa, Joyce e Bruna, que estiveram presentes em todos os momentos do meu mestrado. Aos demais colegas do grupo IME, que contribuíram para a realização deste trabalho, assim como para meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a professora Soraia, que depositou em mim a confiança para o desenvolvimento desse projeto, além de compartilhar seus conhecimentos com paciência e excelência.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, assim como o Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

“Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.”

(J. R. R. Tolkien)

## RESUMO

A osteoporose, doença resultante do aumento da reabsorção óssea, está relacionada com o enfraquecimento do tecido ósseo e a incidência de fraturas. O aumento da taxa de renovação óssea ocorre devido ao desbalanço da atividade de células específicas do tecido que pode ser resultante de diversos fatores, como a deficiência de estrogênio. Terapias medicamentosas e suplementos alimentares que regulam a renovação óssea do tecido são utilizados como forma de tratamento para a osteoporose. Nos últimos anos, as vesículas extracelulares do leite bovino (VEL) demonstraram potencial terapêutico na regulação da atividade de células do tecido ósseo. Contudo, ainda não foi demonstrado as consequências de seu uso na perda óssea induzida na maxila. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração oral das VEL nos parâmetros ósseos e radiculares da maxila em camundongos submetidos à ovariectomia e movimentação dentária ortodôntica (OTM). Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididos inicialmente em 2 grupos, recebendo PBS (controle) ou VEL (tratado) na água de beber. Após 7 dias, os animais foram submetidos a pseudo-cirurgia (SHAM) ou cirurgia de ovariectomia (OVX), e reagrupados em (i) SHAM+PBS; (ii) OVX+PBS, (iii) SHAM+VEL; (iv) OVX+VEL. Após 18 dias do procedimento cirúrgico, todos os animais foram submetidos a OTM. Os resultados dos parâmetros ósseos derivados da OVX não demonstraram alterações significativas na microarquitetura óssea alveolar dos camundongos tratados com as VEL, mas reduziu significativamente a altura da crista alveolar. Ao ser induzido o remodelamento ósseo pela OTM, foi observada maior movimentação dentária nos animais OVX não tratados, não sendo observado esse aumento no grupo OVX tratado com as VEL. A partir da avaliação das células nesse tecido, observou aumento de osteoblastos e osteócitos causado pelo tratamento com as VEL, antes reduzido no grupo OVX não tratado, enquanto o número de osteoclastos e presença de marcadores ósseos como RANKL e relação RANKL/OPG se apresentaram significativamente menores nos animais OVX tratados em comparação aos não tratados de forma local e sistêmica. Além disso, o aumento significativo de odontoclastos nos animais controle OVX foi revertido naqueles que receberam tratamento com as VEL, indicando redução das áreas de reabsorção radicular

inflamatória induzida pela OTM. Após indução da movimentação dentária os marcadores inflamatórios, como TNF, se mostraram aumentados na maxila dos grupos OVX independente do tratamento, contudo, a IL-33, que estava aumentada nos animais OVX não tratados, se apresentou reduzida após o tratamento com as VEL. Células imunológicas sistêmicas se apresentaram reduzidas após o tratamento com as VEL, dado evidenciado pela contagem total e de mononucleares. Dessa forma, o tratamento com as VEL demonstrou uma modulação positiva na presença das células ósseas no tecido e nos marcadores locais e sistêmicos associados ao processo de remodelamento ósseo maxilar e radicular, indicando seu potencial benéfico no tratamento da osteoporose.

**Palavras-chave:** Osteoporose. Movimentação dentária ortodôntica. Vesículas extracelulares. Leite. Maxila. Osteoclasto.

## ABSTRACT

Osteoporosis, a disease resulting from increased bone resorption, is related to the weakening of bone tissue and the incidence of fractures. The increase in the rate of bone turnover occurs due to the imbalance in the activity of specific cells in the tissue that may result from several factors, such as estrogen deficiency. Drug therapies and food supplements that regulate bone tissue renewal are used to treat osteoporosis. In recent years, the extracellular vesicles of bovine milk (MEV) have demonstrated therapeutic potential in regulating bone tissue cells' activity. However, the consequences of its use on bone loss induced in the maxilla have not yet been demonstrated. Thus, this study aimed to evaluate the effect of oral administration of MEVs on bone and root parameters of the maxilla in mice submitted to ovariectomy and orthodontic tooth movement (OTM). Female C57BL / 6 mice were initially divided into 2 groups, receiving PBS (control) or MEV (treated) in drinking water. After 7 days, the animals were submitted to pseudo-surgery (SHAM) or ovariectomy surgery (OVX), and regrouped in (i) SHAM + PBS; (ii) OVX + PBS, (iii) SHAM + MEV; (iv) OVX + MEV. After 18 days of the surgical procedure, all animals underwent OTM. The results of bone parameters derived from OVX did not demonstrate significant changes in the alveolar bone microarchitecture of mice treated with MEV but significantly reduced the alveolar crest's height. When OTM induced bone remodeling, greater tooth movement was observed in untreated OVX animals, with no increase in the OVX group treated with MEVs. From the evaluation of cells in this tissue, an increase in osteoblasts and osteocytes caused by treatment with MEVs, previously reduced in the untreated OVX group, was observed, while the number of osteoclasts and the presence of bone markers such as RANKL and RANKL / OPG ratio were significantly smaller in OVX animals treated compared to those not treated locally and systemically. Besides, the significant increase in OVX control animals' odontoclasts was reversed in those who received treatment with MEV, indicating a reduction in the areas of inflammatory root resorption induced by OTM. After induction of tooth movement, inflammatory markers, such as TNF, were increased in the maxilla of the OVX groups regardless of treatment, but IL-33, which was increased in untreated OVX animals, was reduced after treatment with MEV. Systemic immune cells were reduced after treatment with MEVs, as

evidenced by the total and mononuclear count. Thus, the treatment with MEVs demonstrated a positive modulation in the presence of bone cells in the tissue and in local and systemic markers associated with bone and maxillary remodeling, indicating its beneficial potential in the treatment of osteoporosis.

**Keywords:** Osteoporosis. Orthodontic tooth movement. Extracellular vesicles. Milk. Maxilla. Osteoclast.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC – *Alveolar bone crest* - Crista óssea alveolar
- ALP – *Alkaline phosphatase* - Fosfatase alcalina
- BMD – *Bone mineral density* - Densidade mineral óssea
- BMP – *Bone morphogenetic protein* - Proteína morfogenética óssea
- BV – *Bone volume* - Volume ósseo
- BV/TV – *Bone volume fraction* - Volume ósseo/Volume total
- CEJ – *Cement enamel junction* - Junção cimento-esmalte
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- C-FMS – *Colony stimulating factor 1 receptor* - Receptor do fator 1 estimulador de colônias
- Ct.Th – *Cortical thickness* - Espessura cortical
- Dmp1 – *Dentin matrix acidic phosphoprotein 1* - Fosfoproteína ácida 1 da matriz de dentina
- ESCEO – Consenso de especialistas da Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos de Osteoporose, Osteoartrite e Doenças Musculoesqueléticas
- HCL – *Hydrochloric acid* - ácido clorídrico
- H&E – Hematoxilina-Eosina
- ICB – Instituto de Ciências Biológicas
- IGF-1 – *Insulin-like growth factor-1* - Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-33 – Interleucina 33
- IOF – *International Osteoporosis Foundation* - Fundação Internacional para Osteoporose
- LP – Ligamento periodontal
- MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1* - Proteína 1 quimioatraente de monócitos

M-CSF – *Macrophage colony-stimulating factor* - Fator estimulante de colônia de macrófagos

Micro-CT – *Micro-computed microtomography* - Microtomografia computadorizada

miRNA – Micro-RNA

mL – Mililitro

NFATC1 – *Nuclear factor of activated T-cells* - Fator nuclear das células T ativadas

nm – Nanômetro

OIRR - *Orthodontically Induced Inflammatory Root Resorption* - Reabsorção inflamatória radicular induzida por movimentação ortodôntica

OSX – Osterix

OPG – Osteoprotegerina

OPN – Osteopontina

OVX – Ovariectomia

OTM – *Orthodontic tooth movement* - Movimentação dentária ortodôntica

PGE2 – Prostaglandina E2

PTH – Paratormônio

RANK – *Receptor activator of nuclear factor kappa B* - Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL – *Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

RMD – *Root mineral density* - Densidade mineral radicular

RNA – *Ribonucleic acid* - Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

RNA<sub>t</sub> – RNA transportador

RT-PCR – *Reverse transcription polymerase chain reaction* - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RUNX2 – *Runt-related transcription factor 2* - Fator de transcrição relacionado ao Runt

2

RV/TV – *Root volume per total volume* - Volume radicular/volume total

SMI – *Structure model index* - Índice de modelo de estrutura

Tb.N – *Trabecular number* - Número de trabéculas

Tb.Th – *Trabecular thickness* - Espessura trabecular  
Tb.Sp – *Trabecular separation* - Separação trabecular  
TGFβ-1 – *Transforming growth factor beta-1* - Fator de transformação do crescimento beta 1  
Th2 – *T helper type 2 cell* - Célula T helper 2  
TNF – *Tumor necrosis factor* - Fator de necrose tumoral  
TNF-α – *Tumor necrosis fator alpha* - Fator de necrose tumoral alfa  
TRAP – *Tartrate-resistant acid phosphatase* - Fosfatase ácida tartarato-resistente  
VEGF – *Vascular endothelial growth fator* - Fator de crescimento endotelial vascular  
VEL – Vesículas extracelulares do leite  
WISP-1 – *WNT1-inducible-signaling pathway protein 1* - Proteína 1 da via de sinalização induzível por Wnt1  
Wnt – *Wingless-type MMTV integration site family* – família local de integração MMTV relacionado ao Wingless

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de remodelamento ósseo.....	20
Figura 2. Regulação do remodelamento ósseo via sistema RANK/RANKL/OPG.....	21
Figura 3. Delineamento experimental.....	32
Figura 4. Peso do útero e ingestão hídrica dos camundongos.....	40
Figura 5. Análise da maxila dos camundongos por meio de microtomografia computadorizada.....	42
Figura 6. Análise da altura da crista alveolar por microtomografia computadorizada.....	43
Figura 7. Análise das raízes dentárias da maxila dos camundongos por microtomografia computadorizada.....	44
Figura 8. Análise da movimentação dentária ortodôntica (OTM).....	45
Figura 9. Análise de osteoblastos na maxila.....	46
Figura 10. Análise de osteócitos na maxila.....	47
Figura 11. Análise histológica de osteoclastos na maxila.....	48
Figura 12. Marcadores de remodelamento ósseo na maxila.....	49
Figura 13. Análise da expressão de citocinas inflamatórias na maxila.....	50
Figura 14. Análise da reabsorção inflamatória radicular (OIIRR) da raiz disto-vestibular.....	51
Figura 15. Concentrações de marcadores de remodelação óssea sistêmicos.....	52
Figura 16. Avaliação de células imunológicas sistêmicas.....	53

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1	<i>TECIDO ÓSSEO</i> .....	19
2.1.1	<u>Estrutura do tecido ósseo</u> .....	19
2.1.2	<u>Células ósseas</u> .....	20
2.1.1.1	Osteoblastos .....	20
2.1.1.2	Osteócitos .....	21
2.1.1.3	Osteoclastos .....	22
2.1.3	Remodelamento ósseo .....	22
2.1.4	Osso maxilar e seu remodelamento .....	25
2.2	<i>OSTEOPOROSE</i> .....	27
2.3	<i>VESÍCULAS EXTRACELULARES DO LEITE (VEL)</i> .....	30
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	<i>Objetivos específicos</i> .....	33
3.1.1	<u>Alterações ósseas após indução da ovariectomia</u> .....	33
3.1.2	<u>Indução da remodelação óssea por meio da indução da OTM</u> .....	33
3.1.3	<u>Efeitos sistêmicos</u> .....	33
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1	<i>Protocolo experimental dos animais</i> .....	34
4.2	<i>Indução de osteoporose por ovariectomia (OVX)</i> .....	35
4.3	<i>Isolamento das vesículas extracelulares do leite</i> .....	35
4.4	<i>Indução da remodelação óssea por movimentação dentária ortodôntica (OTM)</i> 36	
4.5	<i>Eutanásia</i> .....	37
4.6	<i>Microtomografia computadorizada (micro-CT)</i> .....	37
4.7	<i>Histomorfometria</i> .....	38
4.8	<i>Contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos no osso alveolar e odontoclastos na superfície radicular</i> .....	39
4.9	<i>Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue</i> .....	40
4.10	<i>Determinação de citocinas por ELISA</i> .....	40
4.11	<i>Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)</i> .....	41

4.12	<i>Análise estatística</i> .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
5.1	<i>Peso do útero e ingestão hídrica</i> .....	43
5.2	<i>Microarquitetura óssea da maxila</i> .....	44
5.3	<i>Análise da altura da crista óssea alveolar</i> .....	46
5.4	<i>Microtomografia computadorizada (micro-CT) das raízes dentárias</i> .....	47
5.5	<i>Movimentação dentária ortodôntica (OTM)</i> .....	48
5.6	<i>Quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos na maxila com OTM</i> .....	49
5.7	<i>Avaliação de marcadores de remodelação óssea na maxila com OTM</i> ...	52
5.8	<i>Marcadores de inflamação óssea na maxila com OTM</i> .....	53
5.9	<i>Avaliação da reabsorção inflamatória radicular induzida por OTM (OIIRR) e OVX na raiz disto-vestibular</i> .....	54
5.10	<i>Avaliação de marcadores de remodelação óssea sistêmicos</i> .....	55
5.11	<i>Avaliação de células imunológicas sistêmicas</i> .....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>
	<b>ANEXO A</b> .....	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente dinâmico, complexo e metabolicamente ativo devido ao processo fisiológico de remodelamento (KENKRE; BASSETT, 2018). Dentre as principais funções dos ossos, encontra-se a sustentação e locomoção corporal, assim como a fixação dos músculos, proteção dos órgãos, produção de células sanguíneas através da medula óssea vermelha e amarela e reserva de minerais importantes. Ademais, o tecido ósseo participa ativamente do metabolismo de micronutrientes como cálcio e fósforo, além de contribuir com o controle e a ação de hormônios como calcitonina, paratormônio e vitamina D (MANOLAGAS, 2000; RUNYAN; GABRICK, 2017). Células específicas deste tecido desempenham funções essenciais durante o processo de formação e reabsorção óssea. Os osteoblastos são as células responsáveis pela deposição da matriz óssea. Ao atingirem a maturidade, essas células se diferenciam em osteócitos e se acumulam no interior do tecido previamente formado e realizam atividades de comunicação celular e nutrição dos ossos (TAKAYANAGI, 2007). De ação contrária, os osteoclastos são responsáveis por digerir a matriz óssea. As células ósseas são responsáveis pelo remodelamento fisiológico do tecido ósseo através dos processos de digestão e reposição da matriz (XIAO et al., 2015). Assim, os ossos são capazes de realizar a sua manutenção continuamente (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Disfunções no funcionamento celular podem levar a alterações metabólicas importantes, o que altera a dinâmica do remodelamento e a taxa de renovação óssea (FIRESTEIN; MCINNES, 2017; KENKRE; BASSETT, 2018). Tais disfunções ocorrem devido ao desbalanço da atuação das células ósseas, caracterizado pela ativação excessiva de osteoclastos em detrimento da produção de matriz colágena pelos osteoblastos. Esse perfil favorece a perda óssea ao contribuir para a diminuição da densidade mineral óssea (BMD), além do aumento da fragilidade dos ossos e do risco de fraturas devido ao consequente desenvolvimento da osteoporose, sendo uma doença de grande importância clínica (COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019). Indivíduos idosos e com carências nutricionais, mulheres na menopausa, alterações endócrinas e uso de medicamentos são alguns fatores associados ao desenvolvimento da osteoporose (EGHBALI-FATOURECHI et al., 2003;

MANOLAGAS, 2000; PINHEIRO et al., 2010). Entre as terapias fundamentadas para tratamento da osteoporose, fármacos antirreabsortivos e anabólicos são utilizados para diminuir a taxa de renovação óssea, assim como a suplementação medicamentosa de cálcio e vitamina D (CHRISTAKOS et al., 2017; KHOSLA; HOFBAUER, 2017). O estilo de vida como a prática de exercícios físicos, dieta equilibrada com consumo de micronutrientes como o cálcio por meio do consumo de produtos como leite e derivados, são medidas utilizadas como tratamento complementar e prevenção da osteoporose (HARVEY et al., 2017; WATSON et al., 2018). Apesar de existirem formas de manejo da osteoporose, o tratamento está mais restrito ao uso de medicamentos, e suplementação com cálcio e vitamina D. Dessa forma, novas alternativas para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas a disfunções metabólicas relacionadas aos ossos se fazem importantes para garantir qualidade de vida para grupos com fatores de risco associados à perda óssea.

Nos últimos anos, outro componente alimentar tem sido utilizado na manutenção da saúde óssea, as vesículas extracelulares do leite (VEL), que são moléculas formadas a partir de endossomos da membrana plasmática. O seu conteúdo é composto de proteínas, lipídeos e ácidos ribonucleicos (RNA) tais como RNA transportador (RNAt), RNA mensageiro (RNAm) e micro-RNA (miRNA) que ao serem transportados por meio das vesículas exercem alguma função em outro sítio no organismo (ZEMPLINI et al., 2019). Células ósseas, como osteoblastos e osteoclastos, demonstraram-se responsivas após tratamento com as VEL, contribuindo para a formação óssea (OLIVEIRA et al., 2016, 2017). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito das VEL na reversão na perda óssea do fêmur induzida por dieta obesogênica, tendo alto potencial também na osteoporose (OLIVEIRA et al., 2020). Apesar de nos últimos anos os estudos do efeito do consumo das VEL na perda óssea terem aumentado, o seu impacto nos diferentes sítios ósseos ainda não foi explorado. Neste contexto, o presente trabalho propõe uma intervenção por meio da administração oral das VEL em camundongos com osteoporose, a fim de investigar a sua influência nos parâmetros ósseos da maxila.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *TECIDO ÓSSEO*

#### 2.1.1 Estrutura do tecido ósseo

O osso é constituído por membranas conjuntivas como o periósteeo e o endósteeo, pela matriz óssea mineral e orgânica, além de células específicas importantes para a o metabolismo do tecido. O periósteeo é a membrana responsável por revestir a superfície externa do osso e possui potencial osteogênico, permitindo crescimento ósseo, enquanto o endósteeo é encontrado na superfície interna dos ossos, local onde se encontra o canal medular (DATTA et al., 2008). A matriz óssea é majoritariamente formada por componentes inorgânicos como os cristais de hidroxiapatita, compostos de fosfato de cálcio, que possuem função de conferir ao osso maior rigidez e resistência. Em contrapartida, a matriz orgânica, é composta por proteínas como colágeno tipo 1, proteoglicanos e glicoproteínas, que contribuem para a manutenção da matriz inorgânica (BUCK; DUMANIAN, 2012).

De acordo com sua anatomia, os ossos podem ser classificados a partir de sua espessura, comprimento e largura em ossos longos, curtos, planos/chatos ou irregulares, respectivamente. O tipo de ossificação, ou seja, o processo de formação dos ossos é determinado a partir de sua histogênese. O processo de diferenciação óssea a partir de condrócitos é chamado ossificação endocondral e formam predominantemente ossos longos e curtos, enquanto o processo de diferenciação a partir de células mesenquimais em osteoblastos (ossificação intramembranosa) dão origem a ossos planos/chatos e irregulares (RUNYAN; GABRICK, 2017). Durante o processo de maturação óssea, o osso imaturo, também denominado primário ou não lamelar, se desenvolve a partir da formação do osteoide pelas células formadoras de matriz. Após maduro, o osso então secundário ou lamelar adquire estrutura organizada de cristais e fibras colágenas, se tornando apto a realizar as funções do tecido. Além da estrutura, o osso pode ser histologicamente classificado em osso cortical ou compacto e em trabecular ou poroso, sendo que o osso cortical confere suporte e proteção contra impactos, enquanto o osso trabecular, localizado no interior

do tecido, se relaciona intimamente com a função metabólica óssea, podendo variar sua estrutura de acordo com cargas e impactos aplicados sobre a mesma (MORGAN; UNNIKRISSAN; HUSSEIN, 2018). A ligação tecidual entre os ossos é mantida por meio das articulações, ligamentos, discos e meniscos, que permitem movimentação, capacidade de receber pressão e impactos (SALVA; MERRILL, 2017). Após o processo de estruturação do esqueleto, células ósseas especializadas irão contribuir para a homeostase desse tecido de forma constante e dinâmica.

### 2.1.2 Células ósseas

O tecido ósseo possui 3 células principais distintas e específicas que são responsáveis pela formação, manutenção e integridade dos ossos.

#### 2.1.1.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são derivados de células tronco mesenquimais indiferenciadas e possuem a função de depositar matriz óssea no tecido. A produção dos osteoblastos a partir de células indiferenciadas ocorre após estímulo osteoprogenitor dependente de fatores de transcrição como o fator de transcrição relacionado ao *runt 2* (*RUNX2/CBFA1*) e osterix (*OSX/SP7*), que controlam a proliferação e a maturação da célula (CAPULLI; PAONE; RUCCHI, 2014; GAUR et al., 2005). Para que esses fatores realizem suas funções, algumas vias de sinalização celular são ativadas como a via canônica da proteína *Wingless* (*Wnt*)/ $\beta$ -catenina, e vias relacionadas ao fator de transcrição SOX9, a proteína *homeobox* MSX-2 e ao fator de ativação da transcrição 4 (ATF4) (FRENCH et al., 2004; RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016). Outros fatores de crescimento tais como o receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF $\beta$ -1), hormônios como paratormônio (PTH) e vitamina D, proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), semaforinas, entre outros, também influenciam a renovação das células tronco mesenquimais para diferenciação dos osteoblastos (DIRCKX et al., 2019; JILKA, 2007). Durante a diferenciação dos osteoblastos, ocorre o aumento da expressão de marcadores como fibronectina, colágeno, osteopontina, osteocalcina, assim como a expressão de fosfatase alcalina (ALP) na fase tardia do

seu amadurecimento (HAN et al., 2018). Quando maduro, o osteoblasto sintetiza a matriz óssea por meio da síntese de colágeno tipo I que posteriormente será mineralizado por meio do depósito dos cristais de hidroxiapatita, realizando a mineralização do tecido.

#### 2.1.1.2 Osteócitos

Osteoblastos maduros migram para o interior da matriz óssea formada e tornam-se osteócitos após a realização de sua função na formação óssea (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014). Durante a transformação dos osteoblastos em osteócitos, marcadores como a proteína esclerostina (SOST), fosfoproteína ácida 1 da matriz de dentina (DMP1) e osteopontina (OPN) tem sua expressão aumentada, indicando a maturação da célula e sua integralização a matriz óssea (PLOTKIN; BELLIDO, 2016). Entre as atividades dessa célula diferenciada está a regulação da troca de nutrientes e oxigênio entre o tecido ósseo e os vasos sanguíneos por meio de junções comunicantes, além do auxílio na produção de colágeno, na estrutura e mecanotransdução óssea, e no processo de remodelamento (HEMMATIAN et al., 2017). Os osteócitos também participam da produção de moléculas como o ligante do receptor ativador do fator nuclear *kappa* beta (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), regulando a remodelação óssea (PRIDEAUX; FINDLAY; ATKINS, 2016). Além disso, os osteócitos maduros respondem a estímulos bioquímicos e ao estresse mecânico e podem controlar o remodelamento ósseo a partir da regulação negativa da via *Wnt*/ $\beta$ -catenina por meio da produção da esclerostina (HAN et al., 2018). A super expressão do gene *SOST* pode levar a diminuição da BMD devido a inibição da sinalização da via *Wnt* (TU et al., 2012). Contudo, quando em concentrações reduzidas ou ausente, a esclerostina está relacionada com o aumento da BMD, demonstrando que os osteócitos possuem grande importância no remodelamento do tecido (LIN et al., 2009; ROBLING et al., 2008; TU et al., 2012).

### 2.1.1.3 Osteoclastos

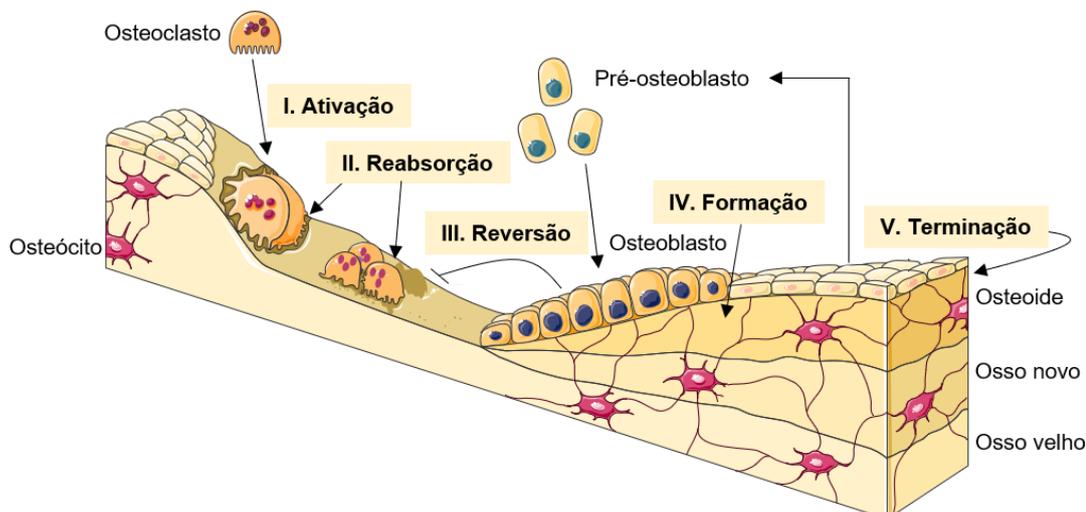
Os osteoclastos são células multinucleadas formadas a partir da fusão de progenitores de monócitos/macrófagos e possuem a função de reabsorver a matriz óssea existente (MARTIN, 2013). A diferenciação dos osteoclastos depende de fatores como o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), secretado pelas células do sistema imunológico, além da presença de RANKL, produzido pelos osteoblastos. O M-CSF e o RANKL, ao se ligarem no receptor do fator 1 estimulador de colônias (C-FMS) e receptor ativador do fator nuclear *kappa* beta (RANK), respectivamente, iniciam a produção e maturação das células reabsortivas (BOYCE, 2013; SONG et al., 2019).

Durante a reabsorção, os osteoclastos são encontrados em depressões ou lacunas ósseas na matriz denominadas lacunas de *Howship*. Para realizar a digestão do osso, os osteoclastos secretam proteases que digerem a matriz orgânica e aumentam a produção de ácidos como o clorídrico (HCL) para reabsorver a hidroxiapatita (HAN et al., 2018). Nos osteoclastos, as bordas protuberantes ou pregueadas da sua estrutura são responsáveis por criar uma zona de vedação ao se ligarem na matriz óssea para digerir a matriz por meio da liberação de prótons H<sup>+</sup> e das enzimas hidrolíticas, como catepsina K, fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) e metaloproteínas (KENKRE; BASSETT, 2018). Além disso, nas lacunas reabsortivas dos osteoclastos também ocorre a presença de OPN, uma glicoproteína importante para o processo de reabsorção óssea (LUUKKONEN et al., 2019).

### 2.1.3 Remodelamento ósseo

O remodelamento ósseo é um processo fisiológico que permite a constante manutenção do tecido através da atividade de células reabsortivas, como os osteoclastos, e células que realizam a deposição da matriz óssea, como os osteoblastos (KENKRE; BASSETT, 2018). Diversos estímulos estão associados com a regulação fisiológica desse processo, como a renovação celular óssea e atividade hormonal (DATTA et al., 2008). Estímulos externos como forças mecânicas, a ocorrência de fraturas e o uso de medicamentos orais ativam o remodelamento, assim como a atividade de células imunológicas e a secreção de citocinas, que também

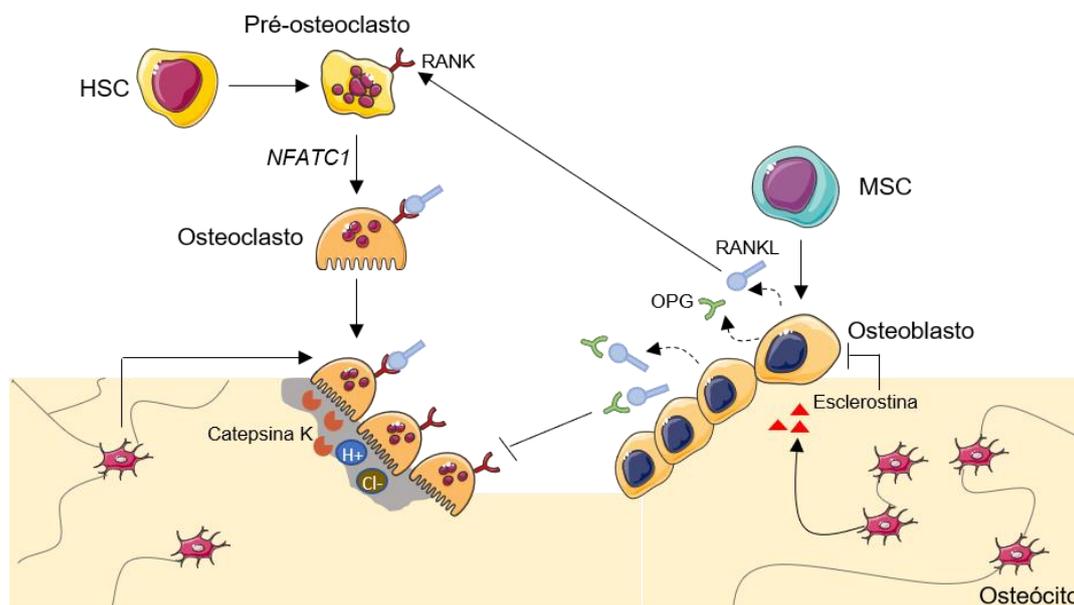
influenciam no controle das células ósseas e moléculas produzidas por elas (MANOLAGAS, 2000). As etapas do remodelamento ósseo podem ser divididas em cinco, as quais se iniciam na atividade reabsortiva dos osteoclastos e se finalizam com a formação da matriz óssea dos osteoblastos, que, posteriormente, se diferenciam em osteócitos (**Figura 1**) (KHOSLA, 2001; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).



**Figura 1. Fases de remodelamento ósseo.** I) Ativação: momento no qual os osteoclastos maduros iniciam sua atividade reabsortiva no osso subjacente; II) reabsorção: momento no qual ocorre a formação da lacuna óssea, ou seja, formação de depressões nos locais que estão sendo digeridos pelos osteoclastos; III) reversão: fase que a atividade osteoclástica é interrompida e, concomitantemente, se inicia a ativação dos osteoblastos; IV) formação: etapa em que ocorre formação do osteoide, seguido da deposição de matriz óssea orgânica e inorgânica pelos osteoblastos; v) terminação: momento em que há a finalização da calcificação tecido. Imagem criada utilizando mix de figuras do Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) de acordo com o Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

O processo de remodelamento ósseo ocorre por meio da ação das células ósseas, que ativam moléculas como o ligante RANKL, o receptor RANK e a proteína OPG, necessários para a sinalização celular (XIAO et al., 2015). O sistema RANK/RANKL/OPG é um dos principais mecanismos associados a regulação do metabolismo ósseo (**Figura 2**). O RANKL é produzido pelos osteoblastos e, em sequência, se liga ao receptor RANK localizado na superfície dos pré-osteoclastos formados a partir dos macrófagos (HENRIKSEN et al., 2009; KENKRE; BASSETT, 2018). Ao ocorrer essa ligação uma cascata de sinalização é ativada, sendo crucial a

ativação do fator nuclear das células T ativadas (*NFATC1*) por ser o principal fator de transcrição relacionado com a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros (BOYCE, 2013; TAKAYANAGI, 2007). A ligação do RANKL ao receptor RANK permite que ocorra a maturação e ativação de osteoclastos e, com isso, a digestão da matriz óssea anteriormente formada (KEARNS; KHOSLA; KOSTENIUK, 2008).



**Figura 2. Regulação do remodelamento ósseo via sistema RANK/RANKL/OPG.** Os pré-osteoclastos derivados das células-tronco hematopoiéticas (HSC) são ativados por meio da ligação do RANKL, produzido pelos osteoblastos, no receptor RANK. Após a ligação, ocorre a transcrição gênica de *NFATC1* que estimula a diferenciação dos osteoclastos em células maduras que iniciam a reabsorção óssea por meio da liberação de enzimas hidrolíticas e produção de ácido clorídrico (HCl). Os osteoblastos são formados a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSC) e produzem RANKL e OPG. A OPG cessa a reabsorção ao se ligar ao RANKL, impedindo a ativação dos osteoclastos para iniciar sua diferenciação e deposição óssea. Os osteócitos atuam na ativação dos osteoclastos e na produção de esclerostina, o que inibe a ação dos osteoblastos. Imagem criada utilizando mix de figuras do Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) de acordo com o Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Os osteoclastos ativos reabsorvem a matriz óssea orgânica por meio de enzimas como a catepsina K, TRAP e metaloproteínas, que quebram as fibras de colágeno presentes no tecido. A matriz inorgânica é digerida devido à presença da

anidrase carbônica, que promove a retirada de íons bicarbonato, assim como a entrada de íons cloro associada a produção de íons hidrogênio, aumentando a produção de HCL na matriz (KENKRE; BASSETT, 2018). Quando a atividade dos osteoclastos precisa ser cessada, os osteoblastos novamente assumem o controle, desta vez por meio da produção de OPG, proteína que se liga ao RANKL, impedindo sua ligação ao receptor RANK e consequente maturação de pré-osteoclastos (KHOSLA, 2001). Nesse contexto de remodelamento, os osteócitos também estão presentes, pois podem produzir ou inibir as moléculas RANKL e OPG. É importante ressaltar que a relação RANKL/OPG define o estado metabólico dos ossos, visto que, quando há maior produção do ligante RANKL e menor produção do ligante OPG, ocorre maior ativação de osteoclastos e, conseqüentemente, maior reabsorção do tecido (HENRIKSEN et al., 2009).

A mineralização ou formação do tecido ósseo ocorre a partir da ação dos osteoblastos após a inibição da atividade dos osteoclastos via produção de OPG (KHOSLA, 2001). Para que esse processo ocorra, minerais como fósforo e cálcio se precipitam e se depositam gradualmente em forma de fosfato de cálcio, que se associam às fibras colágenas formando o osteoide ou osso novo (HAN et al., 2018). Proteínas como colágeno, osteocalcina e a enzima ALP óssea, são produzidas pelos osteoblastos durante a mineralização e contribuem para a deposição dos minerais no tecido em forma de cristais de hidroxiapatita até o término da calcificação (KATSIMBRI, 2017). Os osteócitos também contribuem com transporte de cálcio e deposição de colágeno para a formação da matriz, além de desempenharem suas funções relacionadas ao metabolismo do tecido (PRIDEAUX; FINDLAY; ATKINS, 2016).

#### 2.1.4 Osso maxilar e seu remodelamento

O osso alveolar e cortical maxilar é de grande importância para a odontologia, visto que o processo de remodelamento ósseo na cavidade oral interfere diretamente na dentição e no tratamento odontológico, além de ser importante para a mastigação (ALRAJHI et al., 2020; PORTO et al., 2020). O osso alveolar se encontra associado aos dentes por meio do ligamento periodontal (LP), formado por tecido conjuntivo

fibroso e tem importante função de suporte. O LP está localizado na fração entre cimento do dente e a parte óssea, denominada lâmina dura, e, juntos, formam o periodonto (LI et al., 2018c). O osso alveolar e o cimento radicular sofrem remodelamento ósseo fisiológico constantemente, contudo, quando há aplicação de força, como no caso de aparelhos ortodônticos, há alterações no ambiente vascular local que interfere no processo de remodelamento (KAPOOR et al., 2014). A diminuição da perfusão sanguínea e o desenvolvimento de inflamação tecidual devido à presença de força e carga mecânica aumentam a produção de prostaglandinas da série par, citocinas e quimiocinas, como interleucina 1 (IL-1), interleucina (IL-6), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), prostaglandina E2 (PGE2), fator de necrose tumoral (TNF) e RANKL, os quais ativam o processo de reabsorção óssea (DI DOMENICO et al., 2012; KAPOOR et al., 2014). No local onde ocorre a compressão do dispositivo devido a força mecânica (direção em que o dente foi movimentado) prevalece a reabsorção do osso alveolar com aumento da osteoclastogênese (ASANO et al., 2011). Em contrapartida, no lado oposto ao local de compressão (lado de tensão), a perfusão sanguínea é mantida e o ambiente vascular torna-se propício para a produção de osteoblastos devido ao aumento da expressão de fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- $\beta$  e BMP, além do aumento da produção de OPG na área de reabsorção (BALOUL, 2015; LI et al., 2018c).

Em estudo com camundongos submetidos a OTM, foi demonstrado maior atividade de osteoclastos no local de compressão no ligamento periodontal mediado pela ação de RANKL, em sua maior parte, produzido por osteócitos. Além disso, no local de tensão, foi observado maior atividade de osteoblastos (SHOJI-MATSUNAGA et al., 2017). Em estudo semelhante, foi observado que durante a movimentação dentária, a formação óssea no sítio tensional ocorreu através da ativação de vias relacionadas com a ação dos osteoblastos, como a via  $\beta$ -catenina (MAO et al., 2018). Dessa forma, por meio da movimentação dentária ortodôntica ocorre indução do remodelamento dos ossos maxilares na cavidade oral.

Alterações no metabolismo e remodelamento do tecido ósseo podem levar a complicações no funcionamento e estrutura dos ossos, resultando em doenças e

perdas dentárias (WACTAWSKI-WENDE, 2001). É importante ressaltar que o osso alveolar é essencial para o periodonto e a deficiência de estrogênio está relacionada com a perda óssea oral, aumentando a perda óssea alveolar e diminuindo a retenção dos dentes (VARGAS-SANCHEZ et al., 2020). Indivíduos com perda óssea ou osteoporose podem apresentar perda dentária prematura (KRIBBS, 1990; NICOPOULOU-KARAYIANNI et al., 2009; TOUNTA, 2017). Além disso, a deficiência de estrogênio também pode influenciar a qualidade das raízes dentárias, contribuindo para sua reabsorção (AMARO et al., 2020). As raízes dentárias são revestidas pelo cemento radicular e suportadas pela fração óssea, LP e gengiva (BALIC, 2018). A OTM, por exemplo, além de levar a reabsorção óssea induzida, contribui para a reabsorção radicular, por meio da atividade de células reabsortivas semelhantes aos osteoclastos, denominadas odontoclastos, podendo comprometer a qualidade das raízes (AMARO et al., 2020; WELTMAN et al., 2010). Em estudo com ratas OVX, foi observado maior reabsorção óssea alveolar, associada a maior reabsorção inflamatória radicular induzida por movimentação dentária ortodôntica. Neste mesmo estudo, ao serem tratados com o hormônio estrogênio, os camundongos demonstraram menor perda óssea alveolar e menor reabsorção radicular quando comparados aos animais OVX não tratados (LI et al., 2020). Os mesmos resultados foram observados por Sirisoontorn e colaboradores (2011), que demonstraram aumento da reabsorção alveolar e radicular em ratas OVX em comparação ao seu controle SHAM (SIRISOONTORN et al., 2011). Sendo assim, com a deficiência de estrogênio, a possibilidade de perda óssea no osso maxilar deve ser acompanhada para evitar complicações associadas à saúde bucal, como a osteoporose.

## 2.2 OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença crônica caracterizada pela redução de massa óssea com prejuízo na microarquitetura do tecido, o que leva a fragilidade do esqueleto, associada a fraturas e redução de força física (ERIKSEN, 2012). Estima-se que no de 2050, haverá cerca de 6,3 milhões de fraturas osteoporóticas por ano no mundo, sendo mais da metade de casos na América Latina e Ásia (ZANCHETTA, 2012). No Brasil, estima-se que existam cerca de 160 mil casos de fraturas em 2050,

principalmente relacionadas ao quadril, sendo que o custo direto aproximado para o tratamento e manejo de fraturas seja de US\$ 3.900 a 12.000, aproximadamente (PINHEIRO; EIS, 2010; ZANCHETTA, 2012). Alterações endócrinas como diminuição do estrogênio, como na menopausa, aumento das concentrações de PTH, doenças metabólicas e inflamatórias como diabetes mellitus, artrite reumatoide, carências nutricionais como de cálcio e vitamina D, e o uso de medicamentos como os glicocorticoides orais, são consideradas como fatores importantes para o desenvolvimento da perda óssea (COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019; RADOMINSKI et al., 2017). Além disso, idosos, indivíduos do sexo feminino ou que possuam histórico de fraturas anteriores ou histórico de fratura materna, baixo peso após os 50 anos de idade ou com complicações neuromusculares e tabagistas, estão predispostos a fraturas osteoporóticas e a complicações da cavidade oral, como menor retenção dentária e susceptibilidade a processos infecciosos (COTTON et al., 2011; DERVIS, 2005; WANG; MCCAULEY, 2016).

Para o manejo da osteoporose, são utilizadas estratégias específicas que visam diminuir a taxa de renovação óssea, assim como propiciar o anabolismo ósseo. Dentre os tratamentos farmacológicos para a osteoporose, existem os medicamentos anabólicos osteogênicos e os medicamentos antirreabsortivos, que diminuem a atividade osteoclástica, como os bisfosfonatos, comumente utilizados no tratamento desta patologia (CUMMINGS et al., 2009; KHOSLA; HOFBAUER, 2017). Além disso, existem medicamentos que englobam ambas as classes: antirreabsortivos e anabólicos (ANAGNOSTIS et al., 2019; KHOSLA; HOFBAUER, 2017). A suplementação de cálcio e vitamina D associada a medicação é amplamente utilizada como terapia para manutenção da BMD (HARVEY et al., 2017; WILLIAMSON et al., 2017). O cálcio é o mineral base para a formação do tecido (LI et al., 2018b), e a vitamina D atua no metabolismo do cálcio e remodelamento ósseo (KHUNDMIRI; MURRAY; LEDERER, 2016). O consenso de especialistas da Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos de Osteoporose, Osteoartrite e Doenças Musculoesqueléticas (ESCEO) e a Fundação Internacional para Osteoporose (IOF) (2017) determinam que a suplementação de cálcio e vitamina D de forma conjunta pode contribuir para a redução de fraturas, sendo recomendada como conduta para

pacientes com osteoporose (HARVEY et al., 2017; KRUGER et al., 2018). Contudo, a suplementação isolada de ambos micronutrientes possui evidências controversas, além de que os efeitos colaterais da suplementação de cálcio como formação de cálculos renais e sintomas gastrintestinais, podem ser considerados fatores limitantes para a prática clínica (HARVEY et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

Em relação à alimentação, a ingestão de leite e derivados é recomendada como conduta dietética e preventiva da osteoporose por se tratarem de produtos fontes de cálcio alimentar e por estarem relacionados com melhores parâmetros ósseos (RADAVELLI-BAGATINI et al., 2014). O Guia Alimentar para a População Brasileira do Ministério da Saúde (2014) recomenda a ingestão de no mínimo 3 porções diárias de leite ou derivados por dia para otimizar o consumo de cálcio (BRASIL, 2014). Ainda que existam benefícios do consumo de leite e/ou derivados na BMD e na incidência de fraturas osteoporóticas em indivíduos, há controversas acerca do efeito do consumo desse grupo de alimentos na prevenção da perda óssea (MATÍIA-MARTÍN et al., 2019; VOGEL et al., 2017). Sendo assim, ainda são necessários estudos para elucidar os benefícios de produtos lácteos na saúde óssea, mas ainda não é consenso que a ingestão de laticínios deva ser estimulada (FARDELLONE, 2019).

Além dos nutrientes ofertados no leite como o cálcio, moléculas como as VEL também compõem os produtos lácteos e realizam importantes funções no metabolismo. Por esse motivo, esses compostos vêm sendo exploradas a fim de entender os mecanismos associados as suas funções no organismo (ZEMPLINI et al., 2017). As VEL estão sendo foco de estudo no âmbito das doenças ósseas, podendo ser utilizadas como futura terapia de pacientes com osteoporose.

### 2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES DO LEITE (VEL)

A produção das vesículas extracelulares ocorre por meio do processo de invaginação da membrana celular, com formação vesículas que abrigam importantes substâncias citoplasmáticas como proteínas, lipídeos RNA codificantes e não codificantes, tais como RNAt, RNAm e miRNA (HERWIJNEN et al., 2018; HUANG et al., 2013). Após o processo de biogênese, os endossomos derivados da membrana plasmática podem ser destinados a vias de degradação mediadas pelo lisossomo ou enviadas para o espaço extracelular, se tornando então vesículas extracelulares da célula (HURLEY; ODORIZZI, 2012). A composição e abundância do conteúdo presente nesses componentes variam de acordo com o ambiente e tipo de célula em que foram formadas (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Na matriz extracelular, as vesículas excretadas se direcionam a diferentes destinos e sítios, podendo atuar de forma variada em diferentes células receptoras (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

A função das vesículas extracelulares foi previamente descrita como produto de descarte celular. Contudo, devido ao conteúdo que transporta e a recentes descobertas da importância metabólica, a principal atividade desses componentes está relacionada com a sinalização celular (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002). Para o desempenho dessa função, glicoproteínas presentes na superfície da bicamada lipídica desses componentes atuam como principal meio de comunicação intercelular, assim como permitem que a absorção das vesículas por outras células seja realizada por meio de endocitose (SUKREET et al., 2016). Células intestinais (WOLF; BAIER; ZEMPLINI, 2015) e do sistema imunológico, como os macrófagos (LÄSSER et al., 2011; PIETERS et al., 2015), são exemplos de células que se beneficiam com a captação de vesículas extracelulares por meio do processo de endocitose. Nos organismos vivos, o tamanho das vesículas produzidas pode variar de 30 a 1000 nanômetros (nm) de diâmetro e são encontrados nos fluidos corporais, como saliva, urina, plasma, leite humano e também no leite de origem animal (HERWIJNEN et al., 2018; LÄSSER et al., 2011).

As VEL têm sido fortemente estudadas para elucidar os possíveis mecanismos de ação e funções do seu conteúdo no organismo (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015; ZEMPLINI et al., 2019). Estudos realizados com leite bovino comercial demonstraram

que o encapsulamento das vesículas extracelulares conferem proteção a seu conteúdo, permitindo que situações como variações de pH e de temperatura não interfiram na estabilidade dos endossomos, tornando-os, portanto, resistentes a processos como a digestão e a tratamentos de fervura e congelamento (IZUMI et al., 2012; PIETERS et al., 2015). Além disso, foi estimado que o leite bovino comercial semi-desnatado contém cerca de  $5 \times 10^{10}$ /mL desses componentes (PIETERS et al., 2015), estando dessa forma presente mesmo após o processo de pasteurização. Dessa forma, ao serem ingeridos via oral, as vesículas extracelulares têm potencial para alcançar o lúmen intestinal e serem absorvidos para entregar seu conteúdo aos tecidos periféricos.

As vesículas extracelulares provenientes do leite possuem grande conteúdo de RNAm de proteínas como  $\beta$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina e fator de alongamento-1 $\alpha$ , além de miRNA (IZUMI et al., 2012). Os miRNA são pequenos RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos e são capazes de regular a expressão gênica a nível pós-transcricional. Dentre os miRNA que foram encontrados e isolados do leite bovino comercial, foi observado em grande número a presença de moléculas relacionadas com a diferenciação de células do sistema imunológico, como miR-21, miR-30a, miR-92a, miR-99a, miR-148a, miR-223 (PIETERS et al., 2015; ZHOU et al., 2011), e também com a diferenciação de células ósseas, como a família miR-29 (LI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016). A atividade das VEL foi descrita no âmbito de doenças relacionadas com a perda óssea, como a artrite reumatoide. Camundongos submetidos à artrite induzida por colágeno foram tratados com VEL adicionados a água de beber. Com o tratamento foi observado atraso na incidência e gravidade da doença, além da diminuição sistêmica de mediadores inflamatórios como IL-6 e proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) (ARNTZ et al., 2015). Ainda demonstrando os benefícios das VEL, foi descrito também sua influência no comportamento de células ósseas. Estudo demonstrou aumento do número de osteócitos na tíbia de camundongos após a administração de VEL na água de beber dos animais, assim como melhorou a microarquitetura do osso lamelar. De forma complementar, a análise da ação das VEL em cultura celular, demonstrou que células tronco mesenquimais da medula óssea humana incubadas com VEL aumentaram

significativamente a diferenciação de osteoblastos, contribuindo para a rápida diferenciação em osteócitos (OLIVEIRA et al., 2016). Outro estudo avaliou a influência das VEL nos osteoclastos, aumentando sua presença, mas reduzindo sua atividade (OLIVEIRA et al., 2017). Esses dados demonstram o potencial das VEL na manutenção positiva do metabolismo ósseo, o que poderia contribuir com o tratamento da perda óssea.

A avaliação do efeito das VEL nas doenças ósseas ainda é bastante escassa na literatura. Até o momento, poucos estudos avaliaram o papel das VEL na microarquitetura óssea em modelo de perda óssea (OLIVEIRA et al., 2020; YUN et al., 2020). De forma interessante, em modelo de osteoporose induzida por ovariectomia (OVX), a administração de  $14.3 \times 10^6$ /mL partículas de VEL na água de beber dos camundongos durante 5 semanas melhorou parâmetros ósseos no fêmur dos animais, além de menor presença de osteoclastos e diminuição da relação RANKL/OPG (OLIVEIRA et al., 2020). Em modelo de osteoporose induzido por glicocorticoide em camundongos, a concentração 1,5mg/kg de vesículas extracelulares do colostro do leite bovino administrada por meio gavagem oral durante 8 semanas demonstrou melhoras significativas na BMD e no volume ósseo (BV) do fêmur dos animais em comparação ao grupo não tratado com as vesículas (YUN et al., 2020). Apesar dessa evidência de possível benefício do tratamento das VEL no tecido ósseo, ainda são necessários mais estudos para determinar de forma mais concreta seus efeitos em diferentes sítios mineralizados. Dessa forma, diante dos benefícios das VEL no funcionamento do tecido ósseo, justifica-se esclarecer a influência desses componentes sobre as células ósseas e seus mecanismos bioquímicos no processo de remodelamento do tecido em modelos de perda óssea, como o modelo OVX, e em diferentes sítios, visto que há escassez de estudos que avaliem a influência das VEL no metabolismo ósseo como no osso maxilar e raiz dentária.

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar o efeito da administração oral das VEL nos parâmetros ósseos e radiculares da maxila em camundongos submetidos à ovariectomia e movimentação dentária ortodôntica.

#### **3.1 *Objetivos específicos***

##### **3.1.1 Alterações ósseas após indução da ovariectomia**

- I) Avaliar a microarquitetura do tecido ósseo da maxila dos camundongos OVX não tratados e tratados com as VEL;
- II) Avaliar o efeito do tratamento com VEL na altura da crista óssea alveolar;
- III) Analisar se o tratamento com as VEL altera a densidade mineral e volume radicular em camundongos submetidos à ovariectomia.

##### **3.1.2 Indução da remodelação óssea por meio da indução da OTM**

- I) Avaliar o efeito do tratamento com as VEL no remodelamento ósseo induzido por movimentação dentária ortodôntica em camundongos OVX;
- II) Avaliar a presença de osteoblastos após OTM
- III) Avaliar presença e atividade de osteócitos após OTM
- IV) Avaliar presença de osteoclastos após indução de remodelação óssea;
- V) Verificar a influência das VEL sobre marcadores de remodelação óssea e inflamatórios envolvidos no metabolismo ósseo após OTM;
- VI) Avaliar o efeito do tratamento das VEL sobre a reabsorção inflamatória radicular induzida por movimentação ortodôntica (OIIRR).

##### **3.1.3 Efeitos sistêmicos**

- I) Verificar a influência das VEL sobre marcadores de remodelação óssea sistêmicos.
- II) Verificar a influência das VEL sobre células imunológicas sistêmicas.

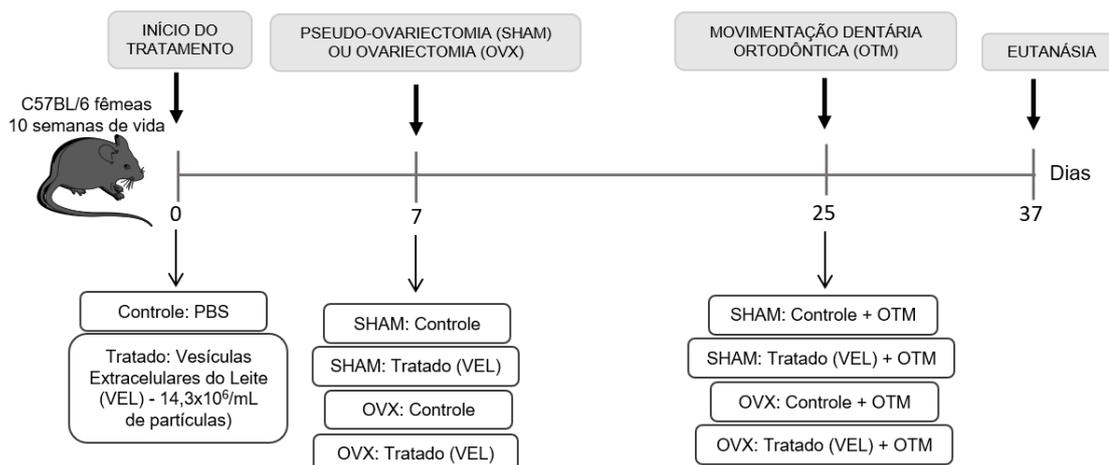
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 *Protocolo experimental dos animais*

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) com o número de protocolo 2/2017 (Anexo A). Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 10 semanas de vida provenientes do biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG em ambiente com controle de luz e temperatura, com acesso livre à água e dieta durante 37 dias. As VEL foram ofertadas por via oral, adicionadas na água de beber dos animais na dose de  $14,3 \times 10^6$ /mL de partículas durante todo o período experimental. O grupo controle recebeu solução PBS pelo mesmo período de oferta das vesículas extracelulares do leite. As mamadeiras dos camundongos foram trocadas 3 vezes na semana e a ingestão hídrica mensurada. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais e de acordo com o seguinte delineamento (Figura 1):

- (i) **Controle SHAM** - PBS e pseudo-ovariectomizado;
- (ii) **Controle OVX** - PBS e ovariectomizado;
- (iii) **VEL SHAM** - Vesículas extracelulares do leite e pseudo-ovariectomizado;
- (iv) **VEL OVX** - Vesículas extracelulares do leite e ovariectomizados.

Nos animais de todos os grupos experimentais foi colocado uma mola no hemiarco direito do primeiro molar superior para realização da indução da remodelação óssea maxilar (OTM), tendo como seu controle o hemiarco esquerdo como controle (sem OTM).



**Figura 3. Delineamento experimental.**

#### 4.2 Indução de osteoporose por ovariectomia (OVX)

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram submetidas à cirurgia para retirada bilateral dos ovários como descrito por Macari et al. (2015). Para o procedimento, a anestesia com solução de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) foi administrada a partir da realização de uma incisão de 2,0 cm na pele e tecido subcutâneo dos animais em decúbito dorsal, seguido da divulsão da parede muscular para atingir a cavidade abdominal. Os ovários foram pinçados, em seguida foi realizada uma ligadura abaixo da tuba uterina e posteriormente o corte para sua retirada. O útero foi recolocado na cavidade abdominal seguido da realização da sutura. Os animais SHAM (pseudo-ovariectomizados) passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, mas sem a retirada dos ovários.

#### 4.3 Isolamento das vesículas extracelulares do leite

As vesículas extracelulares do leite (VEL) foram adquiridas do Laboratório de Reumatologia Experimental (Radboudumc, Nijmegen, Holanda). O isolamento das VEL foi realizado a partir de amostra de leite comercial semi-desnatado por ultracentrifugação como descrito por Pieters et al. (2015). As amostras foram centrifugadas primeiramente a 70.000 g por 1 hora a temperatura de 4°C para remoção dos glóbulos de gordura do leite. As amostras desengorduradas foram então filtradas em papel filtro *Whatman* nº 1, seguido por nº 50. O efluente foi filtrado em um filtro de seringa (0,2 µm) e centrifugado a 110.000 g por 1 hora e meia a temperatura

de 4°C. O *pellet* foi dissolvido em PBS durante a noite a temperatura de 4°C. A mistura total foi centrifugada a 2.000 g por 10 minutos a temperatura de 4°C e o sobrenadante esterilizado com filtro de seringa (0,2 µm). O número de partículas foi determinado em NanoSight LM12.

#### 4.4 *Indução da remodelação óssea por movimentação dentária ortodôntica (OTM)*

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2 mL/25g de peso corporal, com uma solução contendo quetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), respectivamente. Os camundongos foram posicionados em mesa cirúrgica para mantê-los imobilizados e permitir livre acesso a cavidade oral. Um afastador confeccionado com fio de aço foi utilizado para afastar a mucosa jugal do camundongo, permitindo maior amplitude da abertura bucal. Estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil) e iluminação por fibra óptica (Multi-Position Fiber Optic Illuminator System, Cole - Parmer Instrument Company Ltda, Londres, Inglaterra) foram utilizados para possibilitar melhor visualização do local para realização do procedimento. A OTM foi realizada conforme descrito por Taddei et al., (2012). A superfície oclusal do primeiro molar superior direito foram limpas com acetona com o auxílio de um *microbrush* durante 10 segundos. Para a fixação da mola, foi utilizado um selante auto-adesivo (self-etching primer, Unitek/3M, Mineapolis, MN, EUA) e resina fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M). A mola ortodôntica aberta em Níquel-Titânio (Ni-Ti) de 0,25 x 0,76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, EUA) foi posicionada na face oclusal do primeiro molar superior direito e ancorada nos incisivos centrais. Foi preconizada a força de 0,35 N para ativação da mola que foi mensurada através de um dinamômetro (Shimpo Corp., Tóquio, JHS, Japão). Um fio com 0,8 mm de espessura e 4 cm de comprimento (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP, Brasil) foi utilizado para conectar a extremidade da mola ao gancho do dinamômetro. Após o período de fixação do aparelho ortodôntico, os animais foram mantidos com dieta pastosa trocada diariamente durante 12 dias. O hemiarco esquerdo da maxila sem aparelho foi utilizado como controle.

#### 4.5 Eutanásia

Após os períodos experimentais estabelecidos, os animais foram submetidos a eutanásia por sangria por meio de anestesia por meio de injeção intraperitoneal com solução de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) diluídos em NaCl 0,9%. Durante a eutanásia foram removidos sangue e maxila. Todas as amostras foram conservadas em freezer a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises metabólicas e inflamatórias, ou em formol 4% para as análises histomorfométricas. O sangue foi coletado em tubos e então centrifugado para a obtenção do soro e armazenado também a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6 Microtomografia computadorizada (micro-CT)

As maxilas dos camundongos foram escaneadas utilizando tomógrafo microcomputadorizado de alta resolução (microCT) (Skyscan 1174 X-Ray microtomograph, Aartselaar, Bélgica) do Laboratório de Biomateriais da Escola de Engenharia da UFMG para avaliação da microarquitetura do osso trabecular. Para o escaneamento, foram utilizados os parâmetros de voxel isotrópico de  $5\ \mu\text{m}$  (60 kV, filtro de alumínio de 0,5 mm, ângulo de rotação de  $0,5^{\circ}$ ), com o tempo de escaneamento de aproximadamente 30 minutos. As imagens obtidas pelo escaneamento foram reconstruídas utilizando o software NRecon (Skyscan, Bélgica). As maxilas foram posicionadas para padronização da área analisada com auxílio do software DataViewer (Skyscan, Bélgica) e em seguida foram analisados através do software CTAn software (Skyscan, Bélgica). Para a realização de cálculos mais precisos na análise da densidade óssea mineral, o programa foi calibrado por meio de *phantoms* de hidroxiapatita que possuem densidade previamente conhecida. Para a análise da maxila foi realizada as seguintes medidas específicas:

- (i) Microarquitetura óssea maxilar na região da furca do primeiro molar superior (lado controle, sem OTM): para essa análise, foram obtidos os valores de densidade mineral óssea (BMD;  $\text{g}/\text{cm}^{-3}$ ), porcentagem da relação volume ósseo/volume total (BV/TV; %), índice de modelo estrutural (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th;  $\mu\text{m}$ ), número de trabéculas (Tb.N;  $\mu\text{m}^{-1}$ ) e separação das trabéculas (Tb.Sp;  $\mu\text{m}$ ).

- (ii) Altura da crista óssea alveolar (lado controle, sem OTM): a altura foi quantificada através da medida da área entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte (ABC-CEJ) da superfície mesial do primeiro molar superior até a superfície distal do terceiro molar superior na face palatina com o auxílio do *software* ImageJ e ferramenta *freehand line* (National Institutes of Health, MD, EUA).
- (iii) Movimentação dentária ortodôntica (OTM): imagens dos primeiros e segundos molares superiores no sentido sagital foram obtidas a partir do escaneamento dos ossos maxilares por microCT com o auxílio do *software* DataViewer (Skyskan, Bélgica). O CTAn *software* (Skyscan, Bélgica) foi utilizado para mensurar a diferença de medida da OTM da distância linear entre a junção cimento-esmalte (CEJ) do primeiro e segundo molares da hemi-maxila direita (OTM) em relação a hemi-maxila esquerda (controle) do mesmo animal, utilizando a ferramenta *line*. Cinco imagens sagitais por animal foram avaliadas, realizando-se a média destas medidas.
- (iv) Análise da raiz dentária (lado controle, sem OTM): a densidade e volume radicular foram avaliados nas raízes mesio-vestibular, disto-vestibular e palatina do primeiro molar superior e os parâmetros analisados foram densidade mineral radicular (RMD; g/cm<sup>3</sup>), porcentagem de volume radicular/volume total (RV/TV; %) (AMARO et al., 2020).

#### 4.7 Histomorfometria

Para o processamento histológico, as maxilas coletadas e dissecadas no momento da eutanásia foram fixadas com solução de formol 4% tamponado. Após o período de fixação de 48 horas, as maxilas foram conservadas em álcool 70% para posterior utilização. As amostras passaram pelo processo de descalcificação com EDTA 14% e pH: 7,2 por 21 dias com trocas diárias de solução. Em seguida, as peças foram lavadas *overnight* em água corrente para a realização do processamento histológico. Para a obtenção de secções longitudinais padronizadas, 2 cortes com uma navalha foram realizados nas maxilas, sendo o primeiro corte para remoção dos

incisivos e o segundo corte no sentido pósterio-anterior na região da sutura palatina perpendicular ao plano oclusal, para separar o lado controle (esquerdo) do lado experimental (direito). Os tecidos foram impregnados com parafina durante 1 hora e posteriormente foram realizados cortes com 5 µm por meio da microtomia. A técnica Hematoxilina-Eosina (H&E) foi utilizada para coloração dos cortes histológicos para avaliação de número de osteoblastos e osteócitos no tecido. Além disso, foi avaliado por kit de coloração para TRAP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a atividade de osteoclastos. As lâminas obtidas foram avaliadas em microscópio de luz, equipado com câmera digital.

#### *4.8 Contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos no osso alveolar e odontoclastos na superfície radicular*

Após coloração histoquímica por TRAP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e contra coloração com hematoxilina (Sigma-Aldrich) segundo protocolo disponibilizado pelo fabricante, foram obtidas imagens da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior e osso alveolar na região de compressão do ligamento periodontal e furca, respectivamente, com a utilização de um microscópio (Carl Zeiss, Göttingen, Niedersachsen, Alemanha) com câmera digital acoplada (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Honshu, Japão), na objetiva de 10x e 40x.

A densidade de osteócitos por área óssea foi determinada na região da furca da maxila usando o software Adobe Photoshop C6 (Adobe Systems, Inc., San José, CA, Estados Unidos) e ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MD, Estados Unidos). O número de osteócitos e lacunas foi determinado no osso alveolar pela medição da área óssea total na região de análise. A densidade dos osteócitos foi calculada dividindo o número de células/lacunas contadas pela área do osso avaliado no lado experimental.

A contagem de osteoblastos foi realizada ao longo da extensão do osso na área de tensão do ligamento periodontal na região distal da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior, onde células em formato ovoide foram identificadas próximas ao osso alveolar. A contagem foi realizada em 3 cortes por animal e em seguida foi calculada a média de valores para a obtenção do número de osteoblastos no lado experimental.

A contagem dos osteoclastos foi realizada ao longo da extensão do osso alveolar na área de compressão do ligamento periodontal na porção mesial da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior, onde essas células multinucleadas foram encontradas dentro das lacunas de *Howship*. A contagem foi realizada em 3 cortes por animal e em seguida realizada a média de valores para a obtenção do número de osteoclastos, sendo realizada no lado experimental.

A reabsorção radicular inflamatória induzida por OTM (OIIRR) e por OVX foi analisada ao longo da extensão mesial da raiz disto-vestibular no lado de compressão do LP do primeiro molar superior, onde os odontoclastos foram encontrados em depressões na superfície do cimento (lacunas de reabsorção). A contagem foi realizada em 3 cortes por animal, e, então, realizada a média de valores para a obtenção do número de odontoclastos (Resorption gaps/RPm).

#### 4.9 *Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue*

Para contagem total de células, 5µL de sangue foram retirados da cauda do animal, sendo diluídos em 95µL de solução de Turk. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial de células foi então realizada em esfregaço sanguíneo corado com o Kit Panótico Rápido, sendo contadas 100 células em diferentes campos, com zoom óptico de 100x.

#### 4.10 *Determinação de citocinas por ELISA*

Para a quantificação das citocinas no soro foram utilizados kits DuoSet de ELISA (Enzyme Linked ImmuneSorbent Assay). Foram dosados os marcadores de células ósseas RANKL e OPG. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWellTM Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As amostras foram diluídas em solução PBS (Phosphate Buffered Saline) contendo 0,1% de BSA (Bovine Serum Albumin). Foram adicionados 50 µL de solução por poço na concentração adequada do anticorpo de captura específico de cada citocina. A placa contendo a solução com o anticorpo de captura permaneceu a temperatura de 4°C em local úmido e protegido da luz até o dia seguinte, e, após o período, cada poço foi lavado 3 vezes com solução PBS/Tween 0,1%. Em seguida, foi adicionado 100µl

de solução de bloqueio (PBS contendo 1% BSA). O tempo de bloqueio foi de uma hora e a placa foi novamente lavada. Foram adicionados as amostras e os padrões de citocinas a partir de concentrações decrescentes, formando assim a curva padrão. As placas foram incubadas até o dia seguinte nas mesmas condições anteriores. A placa foi novamente lavada e então adicionado 50 µL da solução com anticorpo de detecção em cada poço da placa. A placa foi incubada por duas horas. Transcorrido este período e após a lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e em seguida adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria a 492 nm.

#### 4.11 *Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)*

Para realizar a análise por meio de RT-PCR as amostras de maxila foram isoladas de forma a preservar apenas o osso da região dos molares. As mucosas do palato e da região vestibular da maxila foram descartadas. A extração de RNA foi executada conforme instruções do fabricante Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras de osso foram colocadas em um criotubo com 500 µl de trizol e 2 *beads* metálicas. O criotubo foi colocado em amalgamador adaptado para triturar os ossos. Após protocolo de trituração do tecido foi adicionado 200 µl de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas por 25 minutos 15.000 g. Após centrifugação a fase aquosa foi separada da fase proteica e colocada em um novo tubo. Foi adicionado 500 µl de isopropanol, levado ao freezer -20° por 20 minutos. A amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado em etanol 75%. Após o descarte do álcool foi aguardada a secagem dos tubos por 15 minutos e o pellet foi ressuscitado em 20 µl de água Depec. O RNA foi quantificado. A partir do RNA foi realizada a transcrição para obtenção do cDNA, para isso foi utilizado termociclador (BioRad T100, Hercules, Califórnia, EUA) e a enzima transcriptase reversa SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). O sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) foi utilizado para a análise, e o SYBR® Green PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado.

A expressão gênica dos seguintes marcadores foi avaliada: marcadores de osteoclastos e reguladores negativos de reabsorção óssea - *Rank*, *Rankl*, *Opg* e a proporção (*Rankl/Opg*), bem como esclerostina (*Sost*), *Tnf* e *Il-33*. Como controle foi utilizado expressão do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Os dados foram avaliados utilizando o método Delta-Delta CT ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ). O  $\Delta\text{CT}$  de cada amostra foi calculado, e foi subtraído o valor de CT (*threshold cycle* ou ciclo limiar) de *Gapdh*, dos valores de CT dos genes avaliados. O cálculo do  $\Delta\Delta\text{CT}$  foi realizado utilizando a seguinte fórmula [ $\Delta\text{CT}$  (amostra) -  $\Delta\text{CT}$  (*Gapdh*)]. Após obtenção do valor de  $\Delta\Delta\text{CT}$ , a fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  foi utilizada para comparação da expressão gênica dos ossos dos grupos.

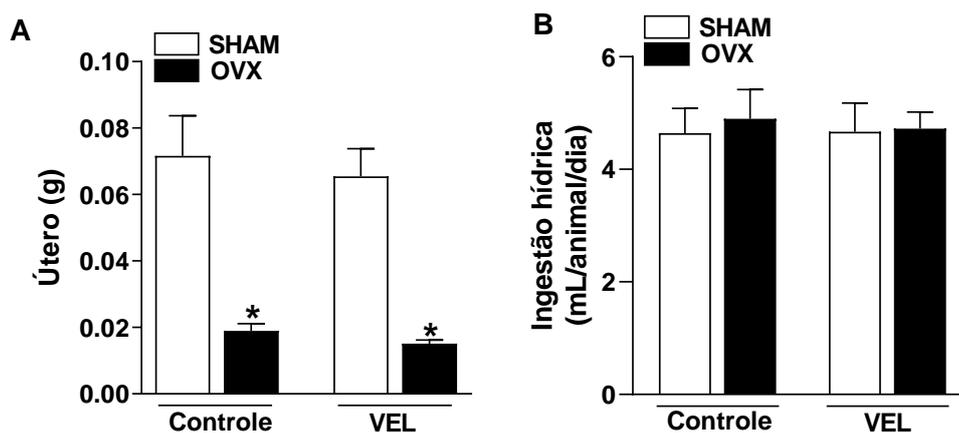
#### 4.12 *Análise estatística*

Após ser realizado o teste de normalidade e verificado que as amostras apresentam distribuição Gaussiana, as comparações estatísticas entre os vários grupos foram realizadas por ANOVA “two way” seguida de pós-teste Bonferroni. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão médio. O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, o software GraphPad PRISM 5.0, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA) foi utilizado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Peso do útero e ingestão hídrica

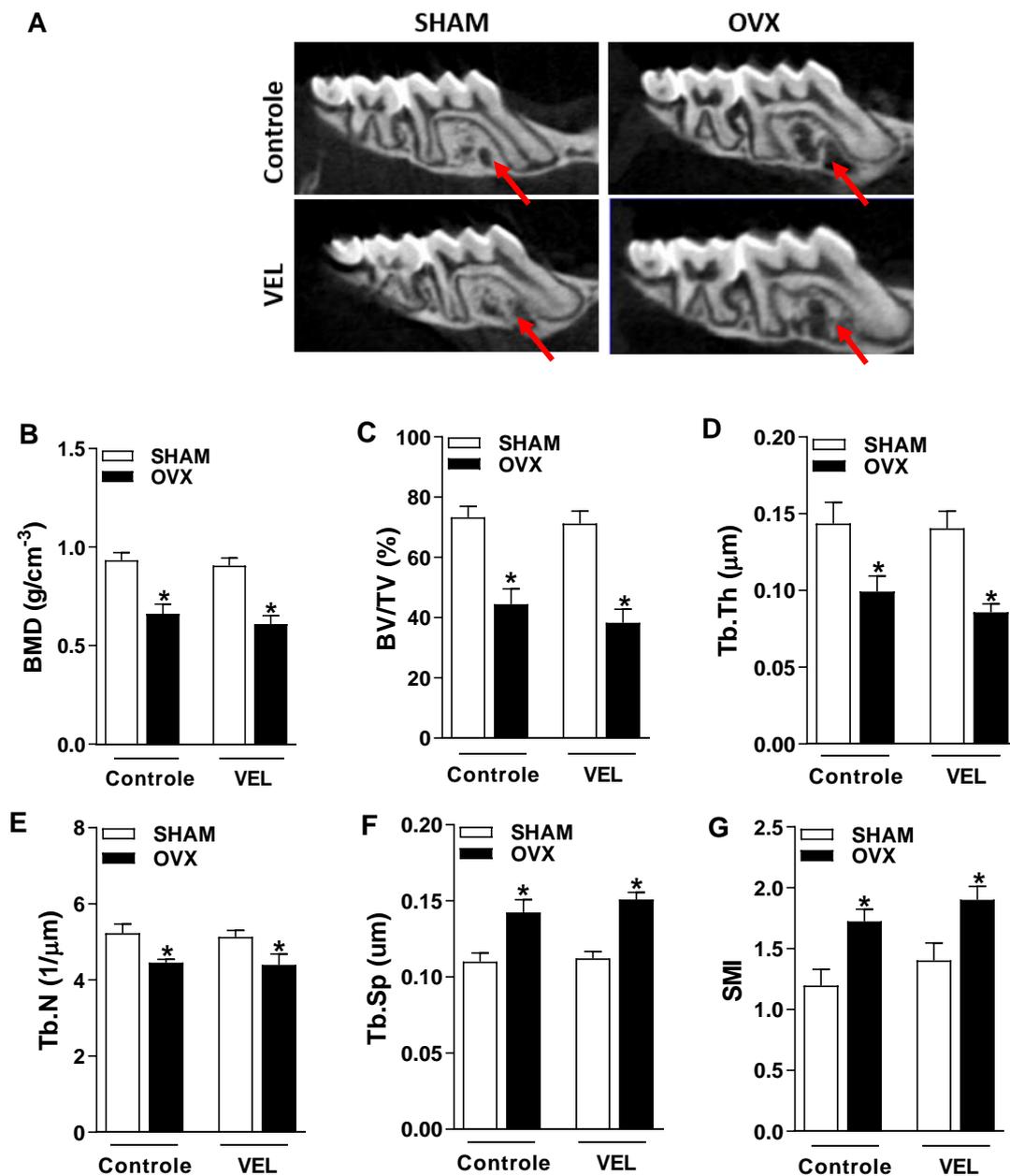
Para verificar a eficácia da cirurgia de ovariectomia, o peso do útero foi aferido, sendo que, conforme esperado, foi observada uma redução no peso do útero daqueles animais OVX independente do tratamento (Figura 4A). Além disso, também foi averiguada a ingestão hídrica desses animais para verificar se haveria alguma alteração pela presença das vesículas na água de beber. Não foi observada diferença entre os grupos avaliados para esse parâmetro (Figura 4B).



**Figura 4. Peso do útero e ingestão hídrica dos camundongos.** (A) Peso do útero em gramas e (B) ingestão hídrica em mililitro por dia por camundongo dos animais pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados com as vesículas extracelulares do leite (VEL) durante 37 dias (n=5-8). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM, ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

## 5.2 *Microarquitetura óssea da maxila*

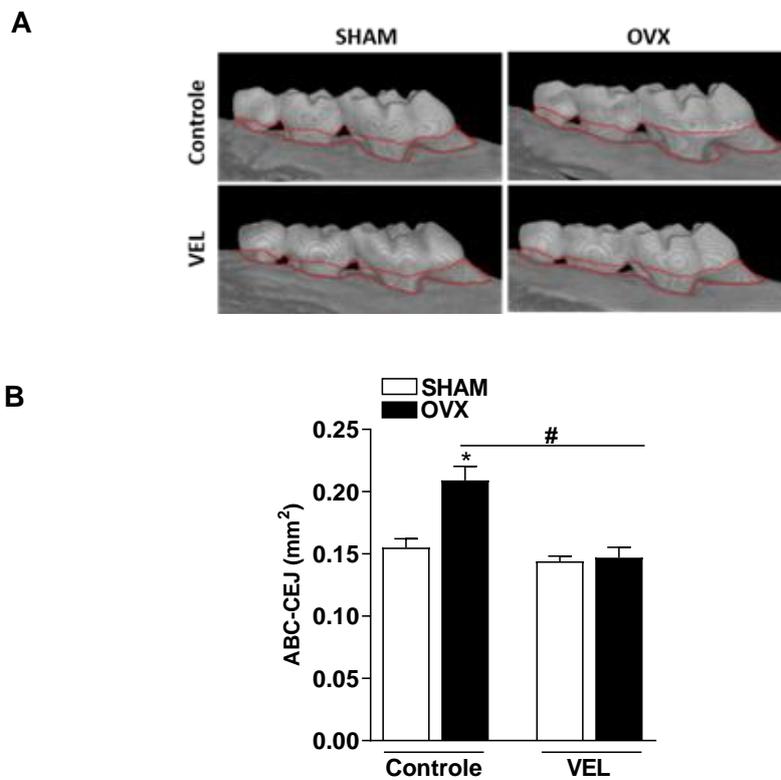
A análise da microarquitetura óssea realizada pela micro-CT na maxila demonstrou diminuição significativa dos parâmetros BMD (Figura 5A), BV/TV (Figura 5B), Tb.Th (Figura 5C) e Tb.N (Figura 5D) nos camundongos OVX, enquanto que os valores de Tb.Sp (Figura 5E) e SMI (Figura 5F) apresentaram-se aumentados em relação aos animais SHAM. Contudo, nenhuma diferença na microarquitetura óssea foi encontrada entre os grupos OVX, sendo também mantido o perfil de perda óssea em relação ao grupo SHAM tratado com as VEL (Figura 5).



**Figura 5. Análise da maxila dos camundongos por meio de microtomografia computadorizada.** (A) Densidade mineral óssea (BMD), (B) Percentual volume ósseo/volume do tecido (BV/TV), (C) Índice de modelo da estrutura (SMI), (D) Espessura de trabéculas (Tb.Th), (E) Separação entre as trabéculas (Tb.Sp) e (F) Número de trabéculas (Tb.N) de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados com as vesículas extracelulares do leite (VEL) durante 37 dias (n=7). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM, ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

### 5.3 Análise da altura da crista óssea alveolar

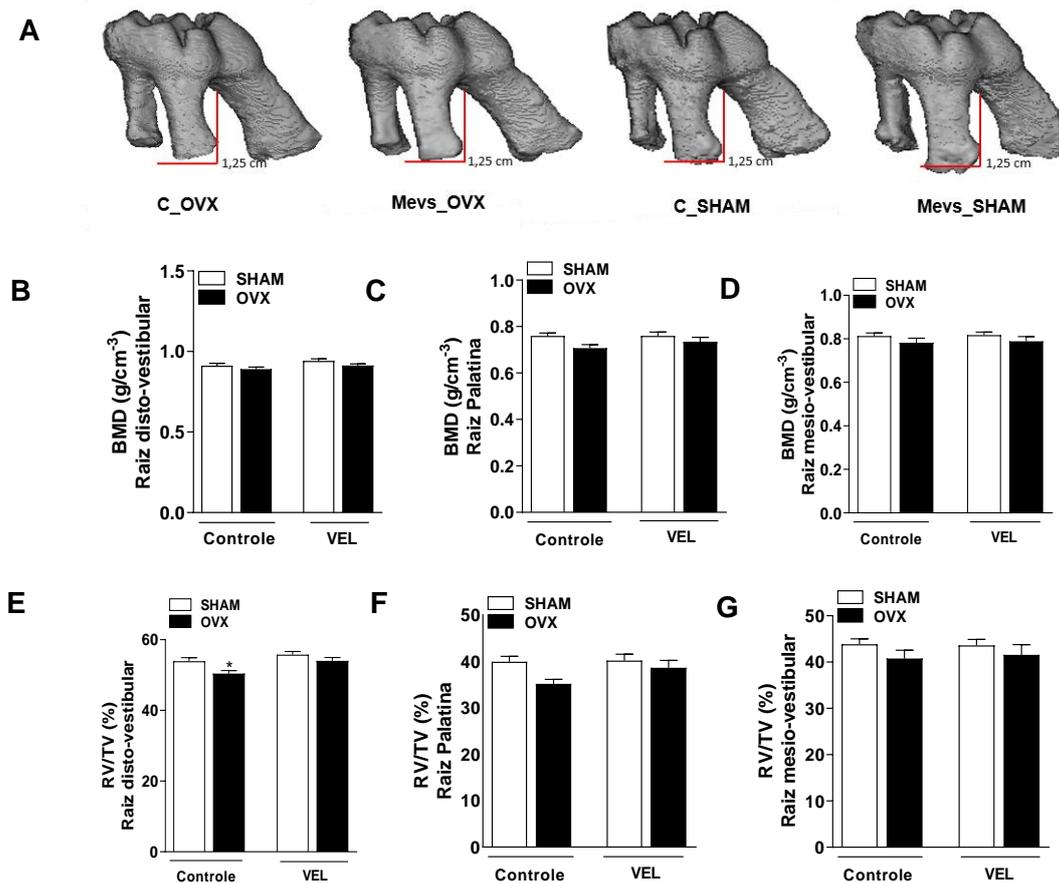
Para a análise da altura da crista óssea alveolar, foi utilizada a medida ABC-CEJ, que se apresentou aumentada nos camundongos controle OVX quando comparados aos animais SHAM. De forma complementar, foi observado que os animais OVX tratados com as VEL demonstraram menor distância entre a crista alveolar e a junção cimento-esmalte ao serem comparados com os animais OVX não tratados (Figura 6A e 6B).



**Figura 6. Análise da altura da crista alveolar por microtomografia computadorizada.** (A) Imagens representativas da superfície mesial do primeiro molar superior até a superfície distal do terceiro molar superior na face palatina e (B) distância da junção cimento-esmalte à crista alveolar (ABC-CEJ) de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados durante 37 dias com as vesículas extracelulares do leite (VEL) sem movimentação dentária ortodôntica (OTM) (n=7). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

#### 5.4 Microtomografia computadorizada (micro-CT) das raízes dentárias

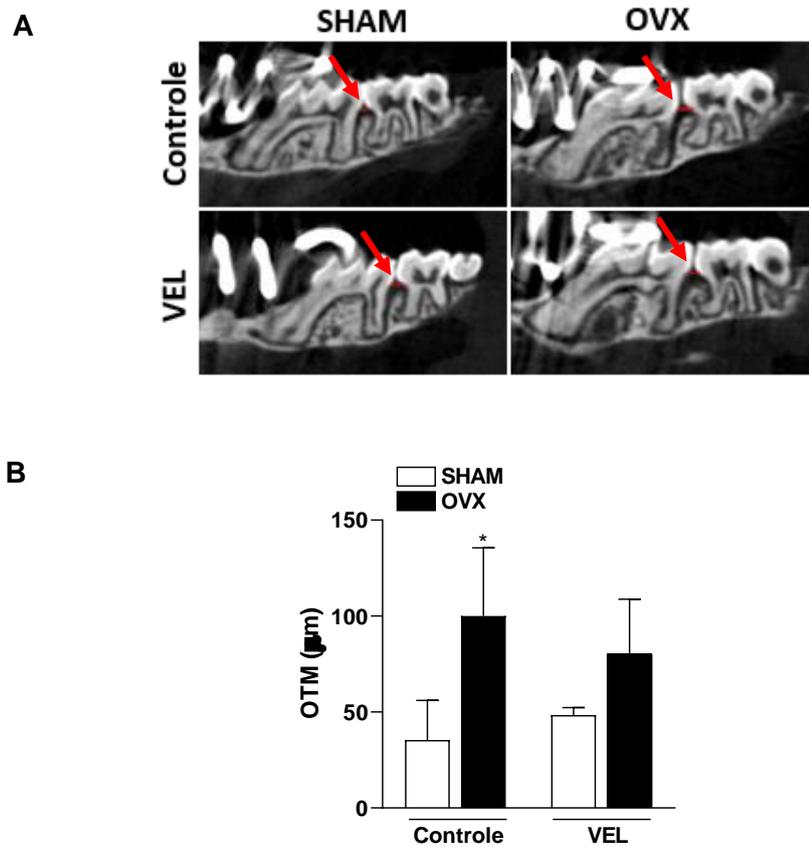
A análise das raízes do dente por meio de micro-CT (Figura 7A) não demonstrou diferença estatística na BMD da raiz disto-vestibular entre os grupos (Figura 7B). Contudo, foi observada diminuição significativa nos valores de RV/TV dos animais controle OVX quando comparados ao SHAM, sendo que o mesmo não foi observado entre os grupos tratados com as VEL (Figura 7E). Para as raízes palatina (Figura 7C e 7F) e mesio-vestibular (Figura 7D e 7G) não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 7. Análise das raízes dentárias da maxila dos camundongos por microtomografia computadorizada.** (A) Imagens representativas das raízes dentárias do primeiro molar superior direito, densidade mineral óssea da (B) raiz disto-vestibular, (C) raiz palatina, e (D) raiz vestibular. Percentual volume ósseo da raiz/volume do tecido da (E) raiz disto-vestibular, (F) raiz palatina e (G) raiz vestibular de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados com as vesículas extracelulares do leite (VEL) durante 37 dias (n=7-8). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

### 5.5 Movimentação dentária ortodôntica (OTM)

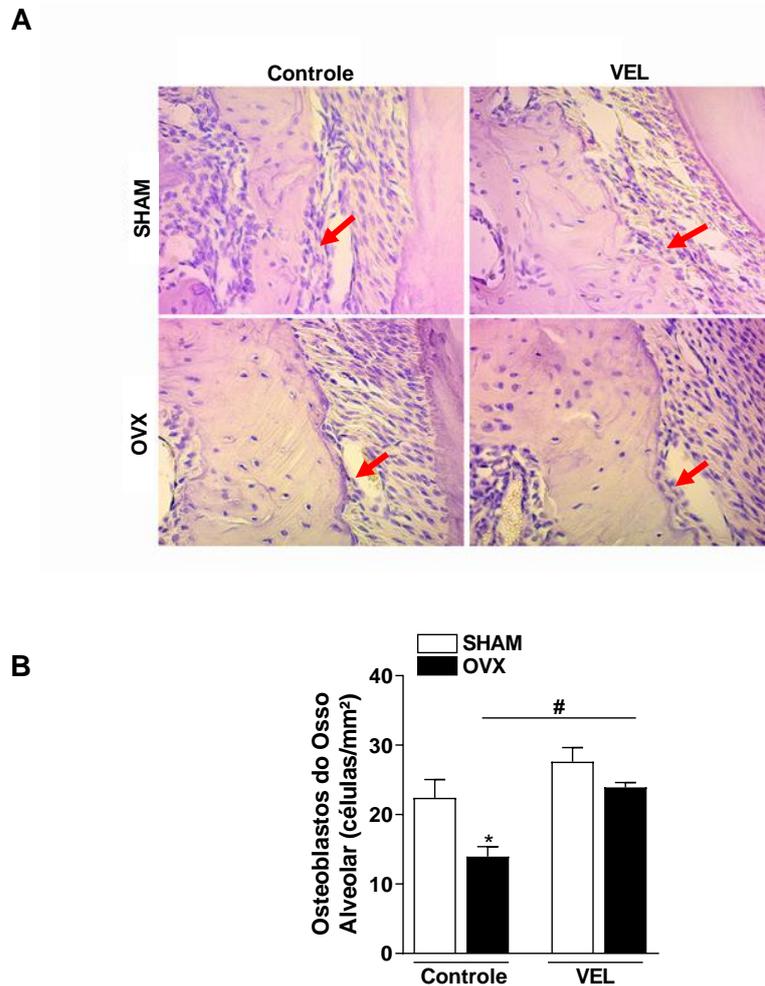
A OTM, também analisada por meio da micro-CT, demonstrou maior movimentação dentária do primeiro molar superior direito dos animais controle OVX em comparação ao grupo SHAM. Contudo, os animais OVX tratados com as vesículas não apresentaram alteração significativa ao ser comparado com o grupo SHAM VEL (Figura 8A e 8B).



**Figura 8. Análise da movimentação dentária ortodôntica (OTM).** (A) Imagem representativa da OTM analisada por meio de microtomografia computadorizada (microCT) dos primeiros e segundos molares superiores no sentido sagital e (B) mensuração da movimentação dentária ortodôntica (OTM) de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados com as vesículas extracelulares do leite (VEL) durante 37 dias (n=5-7). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

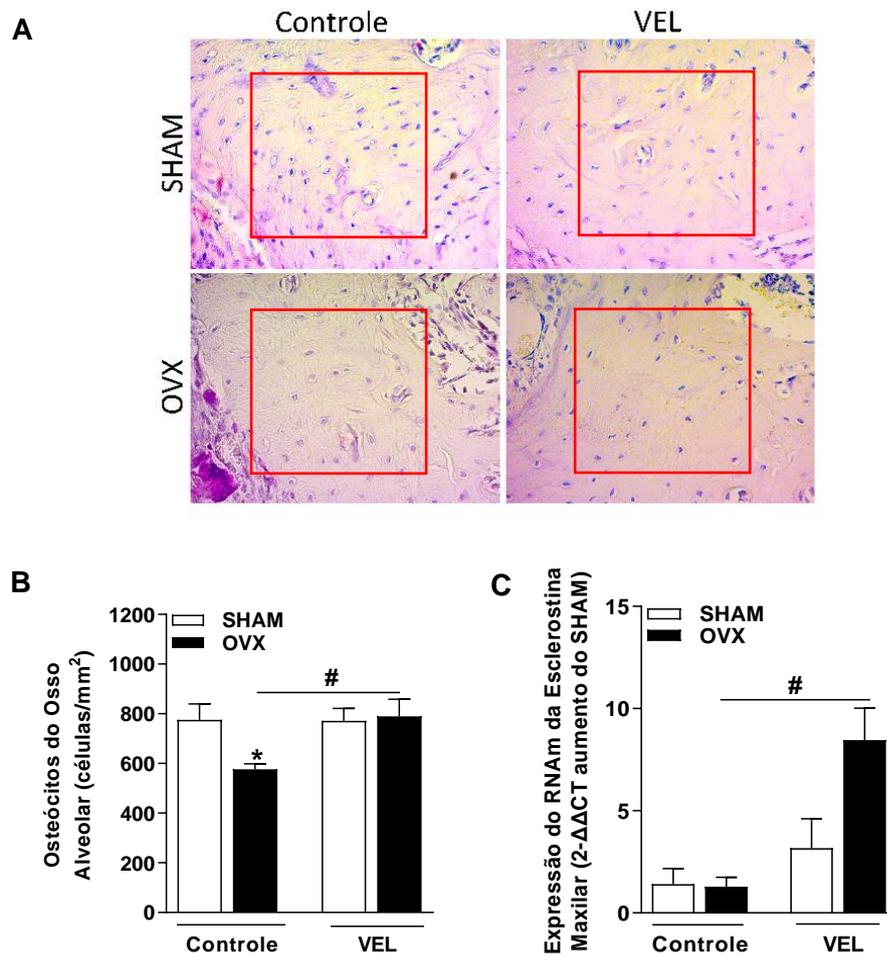
### 5.6 Quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos na maxila com OTM

Os osteoblastos quantificados no osso alveolar após a OTM se apresentaram significativamente reduzidos no grupo de camundongos OVX não tratados em comparação ao controle SHAM. De forma complementar, os animais OVX tratados apresentaram maior número dessas células ao serem comparados com o grupo OVX não tratado (Figura 9A e 9B).



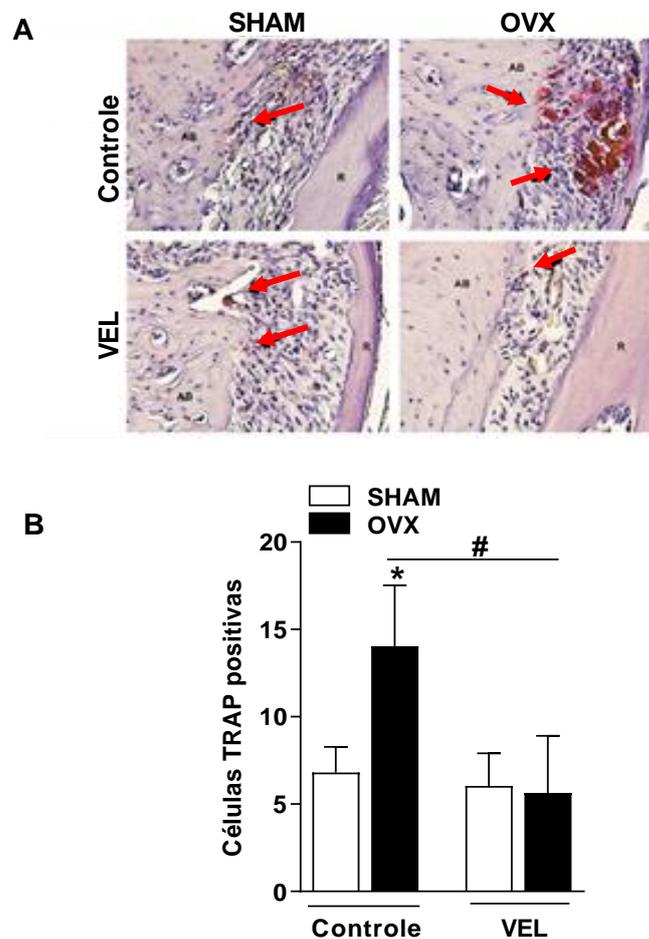
**Figura 9. Análise de osteoblastos na maxila.** (A) Imagem representativa de osteoblastos no osso alveolar (x400) e (B) Contagem de osteoblastos no osso alveolar da maxila de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados durante 37 dias com as vesículas extracelulares do leite (VEL) após movimentação dentária ortodôntica (OTM) (n=5-8). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

O número de osteócitos no osso alveolar dos animais OVX não tratados apresentou-se em menor número quando comparado ao controle SHAM durante a OTM (Figura 10A). Ademais, a contagem de osteócitos do grupo de animais OVX tratados com as VEL apresentou-se maior que o grupo controle OVX (Figura 10B). Da mesma forma, a expressão da esclerostina, um marcador de osteócitos, demonstrou-se significativamente maior nos camundongos OVX tratados com as VEL quando comparados aos animais OVX não tratados (Figura 10C).



**Figura 10. Análise de osteócitos na maxila.** (A) Imagem representativa de osteócitos no osso alveolar (x400), (B) Contagem de osteócitos no osso alveolar da maxila, (C) Expressão de esclerostina na maxila de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados durante 37 dias com as vesículas extracelulares do leite (VEL) após movimentação dentária ortodôntica (OTM) (n=6). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

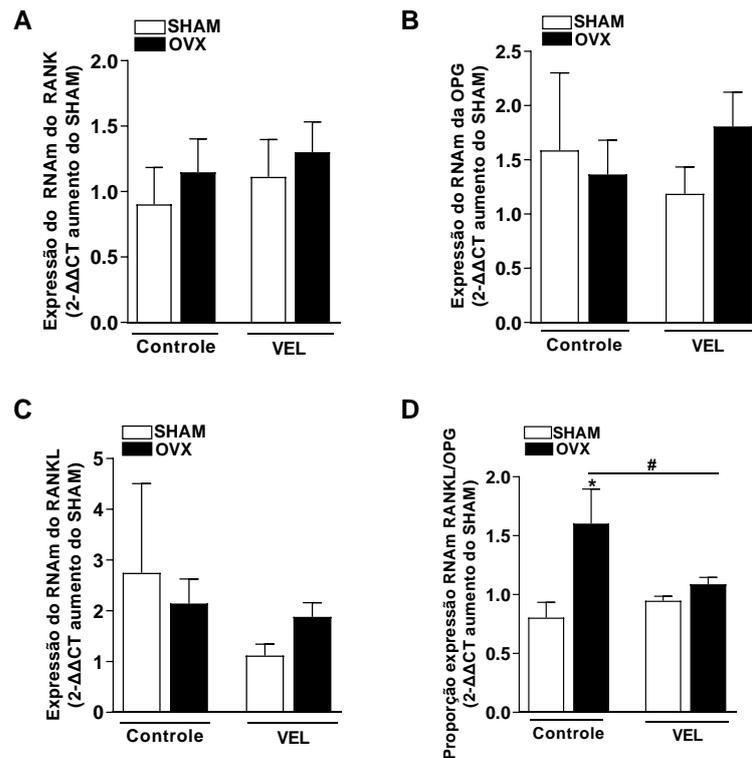
A identificação e contagem de osteoclastos no osso alveolar dos animais com indução de OTM foi realizada por meio da coloração com TRAP. Os animais do grupo OVX demonstraram aumento significativo das células reabsortivas em relação ao grupo SHAM. De forma interessante, houve uma menor presença dos osteoclastos no grupo de animais OVX tratados com as VEL quando comparados ao grupo OVX não tratado (Figura 11A e 11B).



**Figura 11. Análise histológica de osteoclastos na maxila.** (A) Imagem representativa da atividade de osteoclastos analisada por meio da coloração TRAP (x400), (B) Contagem de células TRAP positivas de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados durante 37 dias com as vesículas extracelulares do leite (VEL) após movimentação dentária ortodôntica (OTM) (n=6). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

### 5.7 Avaliação de marcadores de remodelação óssea na maxila com OTM

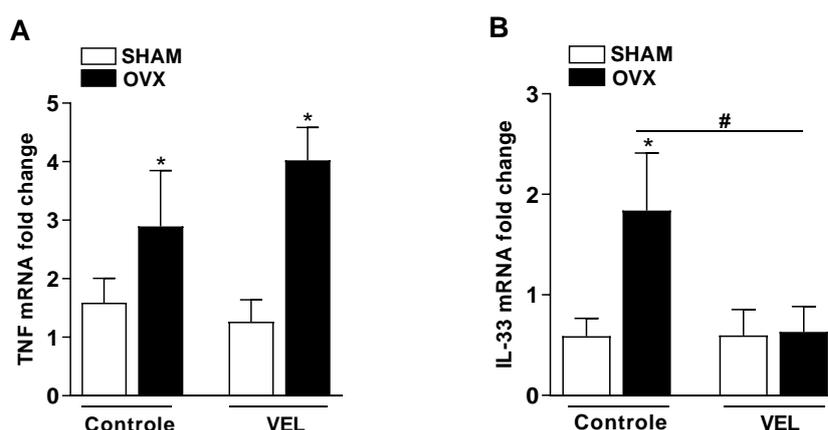
A análise da expressão dos marcadores ósseos analisados na maxila por RT-PCR durante a OTM não demonstrou diferenças significativas entre os grupos para RANK, OPG e RANKL (Figura 12A-C). Contudo, revelou um aumento significativo na relação RANKL/OPG nos animais controle OVX em relação ao SHAM (Figura 12D). Além disso, assim como os dados sistêmicos, foi observada uma menor relação no grupo tratado com as VEL em comparação aos animais OVX não tratados (Figura 12D).



**Figura 12. Marcadores de remodelamento ósseo na maxila.** Análise da expressão de (A) RANK, (B) OPG, (C) RANKL e (D) relação RANKL/OPG de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados durante 37 dias com as vesículas extracelulares do leite (VEL) após movimentação dentária ortodôntica (OTM) (n=6). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

### 5.8 Marcadores de inflamação óssea na maxila com OTM

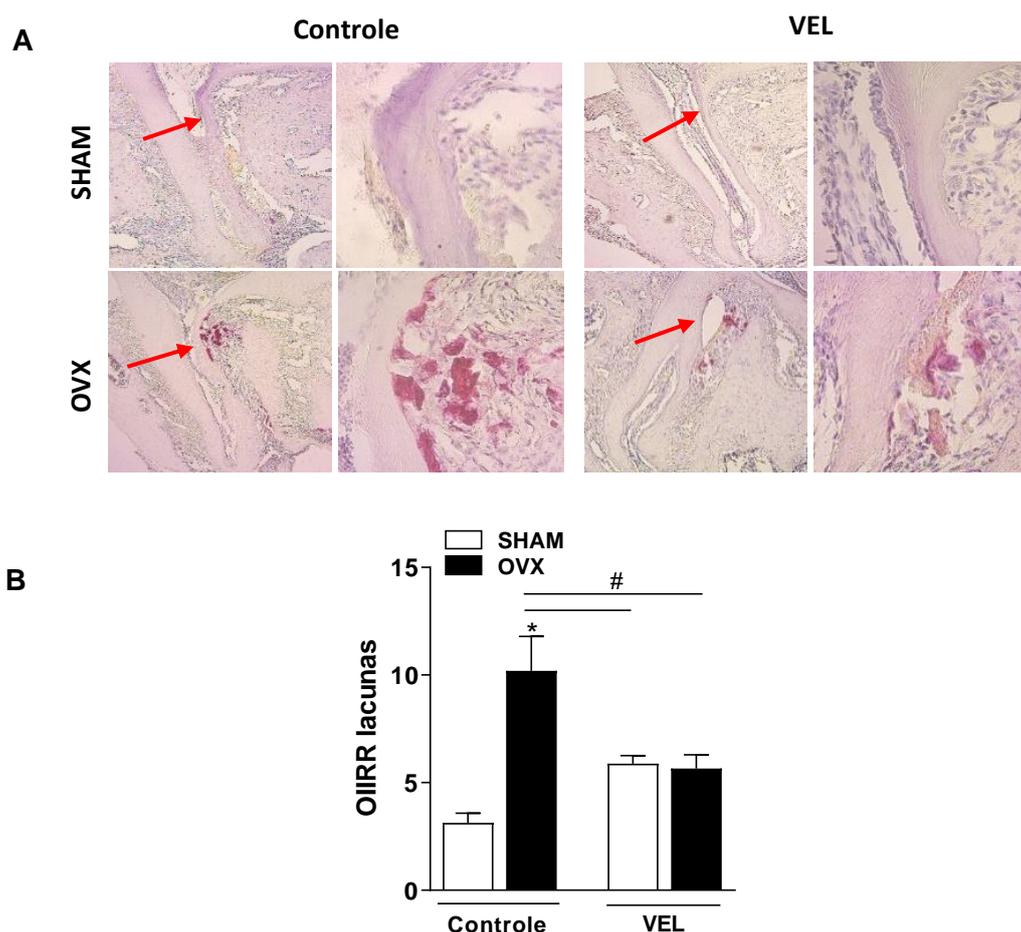
A análise de marcadores de inflamação óssea maxilar foi realizada pela técnica RT-PCR e demonstrou aumento significativo em relação a citocina pró-inflamatória TNF nos animais controle OVX em relação ao SHAM, sendo que o mesmo foi observado nos animais OVX tratados com VEL em comparação ao grupo SHAM tratado (Figura 13A). Em contrapartida, a IL-33 apresentou-se significativamente aumentada no grupo de animais controle OVX em relação ao SHAM, enquanto os animais tratados com VEL apresentaram concentrações significativamente menores da citocina ao serem comparados com o grupo OVX não tratado (Figura 13B).



**Figura 13. Análise da expressão de citocinas inflamatórias na maxila.** (A) Fator de Necrose Tumoral (TNF) e (B) Interleucina-33 (IL-33) de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados durante 37 dias com as vesículas extracelulares do leite (VEL) após movimentação dentária ortodôntica (OTM) (n=6). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

### 5.9 Avaliação da reabsorção inflamatória radicular induzida por OTM (OIIRR) e OVX na raiz disto-vestibular

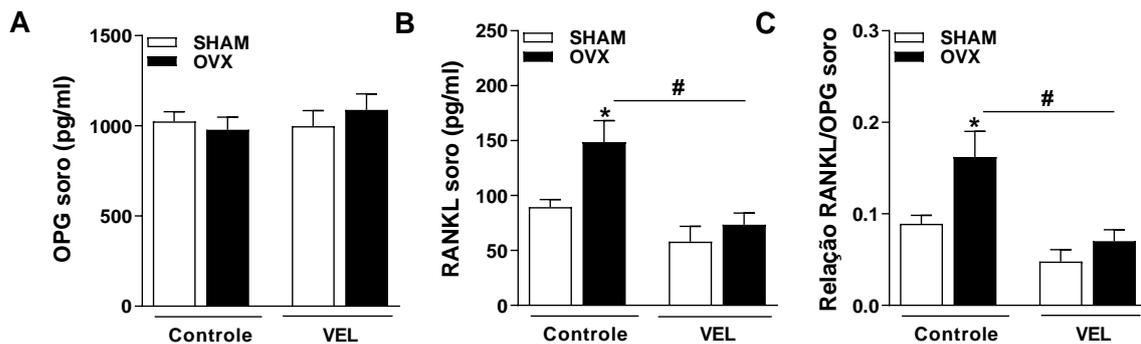
A identificação da OIIRR foi realizada na raiz disto-vestibular na superfície radicular do lado direito do primeiro molar superior dos camundongos na histologia com coloração TRAP. Foi observado aumento significativo de odontoclastos nos animais controle OVX em comparação ao SHAM. De forma contrária, os animais OVX que receberam tratamento com as VEL demonstraram redução das áreas de reabsorção inflamatória (Figura 14A e 14B).



**Figura 14. Análise da reabsorção inflamatória radicular (OIIRR) da raiz disto-vestibular.** (A) Imagens representativas das áreas de OIIRR (x100 e x400) e (B) Contagem das lacunas de OIIRR da raiz disto-vestibular de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados durante 37 dias com as vesículas extracelulares do leite (VEL) após movimentação dentária ortodôntica (OTM) (n=5-7). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

### 5.10 Avaliação de marcadores de remodelação óssea sistêmicos

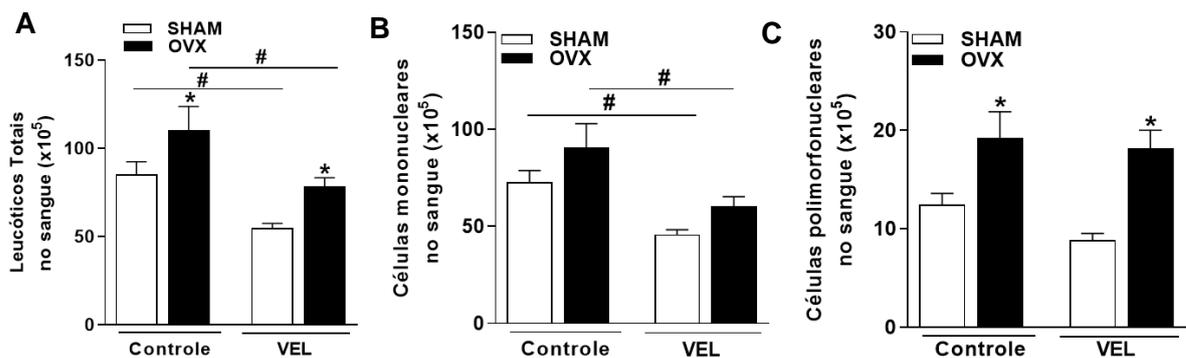
Os marcadores de remodelamento ósseo no soro dos animais avaliados por ELISA não demonstraram diferenças significativas em relação às concentrações de OPG entre os grupos (Figura 15A). Contudo, os camundongos OVX controle apresentaram maior concentração de RANKL e maior relação RANKL/OPG quando comparados ao SHAM (Figura 15B e 15C). Em contrapartida, no grupo de animais OVX tratados com as VEL foi observada diminuição nas concentrações de RANKL, e consequentemente na relação RANKL/OPG, em relação ao grupo OVX não tratado (Figura 15B e 15C).



**Figura 15. Concentrações de marcadores de remodelação óssea sistêmicos.** Análise sorológica de (A) OPG, (B) RANKL e (C) proporção RANKL/OPG de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados com as vesículas extracelulares do leite (VEL) durante 37 dias (n=7-8). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM; # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

### 5.11 Avaliação de células imunológicas sistêmicas

A contagem total de leucócitos no sangue dos animais OVX se mostrou aumentada em relação ao grupo SHAM, independente do tratamento (Figura 16A). Contudo, foi observada uma redução dessa contagem nos grupos tratados com as VEL em relação aos respectivos controles (Figura 16A). Ao ser avaliada a contagem diferenciada das células, os grupos tratados com as VEL apresentaram redução na quantidade de mononucleares comparados aos respectivos controles, enquanto o número de células polimorfonucleares se mostrou aumentada somente nos grupos OVX comparados com seus respectivos SHAM (Figura 16C).



**Figura 16. Avaliação de células imunológicas sistêmicas.** (A) Leucócitos totais, (B) Células mononucleares e (C) Células polimorfonucleares no sangue de camundongos pseudo-operado (SHAM) ou submetidos a cirurgia de ovariectomia (OVX), não tratados (controle) ou tratados com as vesículas extracelulares do leite (VEL) durante 37 dias (n=7). As barras representam valores médios  $\pm$  desvio padrão da média. Diferença estatística representada por \*OVX vs. SHAM, # vs. respectivo controle. ANOVA two way, pós teste Bonferroni,  $P < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

A osteoporose é uma condição clínica que compromete a qualidade de vida devido ao aumento da fragilidade óssea. Idade avançada, menopausa, descontrole hormonal e uso crônico de medicamentos orais são alguns dos fatores relacionados com o desenvolvimento dessa doença em indivíduos (COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019). O seu tratamento ainda é restrito a fármacos específicos antirreabsortivos e anabólicos, como os bisfosfonatos, além da suplementação de cálcio e vitamina D (KHOSLA; HOFBAUER, 2017). Dessa forma, o estudo de tratamentos para a perda óssea advindo de componentes alimentares ainda é necessário para potencializar o benefício a esses pacientes. Neste estudo foi utilizado modelo experimental para indução de osteoporose por meio da deficiência de estrogênio, sendo o osso da maxila o principal sítio de avaliação. (i) Em relação aos parâmetros ósseos relativos à osteoporose induzida por ovariectomia, não foi observada alteração da perda óssea no osso alveolar dos camundongos OVX tratados com as VEL, considerando massa e volume ósseo, mas demonstrou menor reabsorção da crista óssea alveolar nesses animais. (ii) De forma interessante, pela a indução do remodelamento por OTM foi observada redução na área de reabsorção alveolar associado a uma alteração no comportamento das células ósseas pelo tratamento com as VEL em camundongos OVX, favorecendo a formação óssea. (iii) Os marcadores de reabsorção e inflamação óssea local e sistêmica também se demonstrou benéfico para o tratamento da perda óssea na maxila com as VEL, além de reduzir o número de odontoclastos na avaliação da reabsorção radicular.

A perda óssea pode ocorrer devido a diferentes fatores, como a deficiência de estrogênio, sendo que a microarquitetura óssea pode ser analisada para evidenciar estas modificações ósseas (BOUXSEIN et al., 2010). Nos camundongos avaliados no nosso estudo, o grupo de animais controle OVX apresentou acentuada perda óssea alveolar maxilar em comparação ao grupo SHAM. A deficiência de estrogênio proporcionada pelo procedimento de OVX contribuiu para o aumento da taxa de renovação óssea, visto que, quando em concentrações normais no organismo, o hormônio ovariano protege o tecido ósseo da perda excessiva da matriz por meio da proliferação de osteoblastos e apoptose de osteoclastos (FARR et al., 2019; KHOSLA;

MONROE, 2018). As VEL foram utilizadas em nosso estudo com a proposta de reduzir os efeitos negativos da deficiência de estrogênio nos parâmetros ósseos dos camundongos OVX. Contudo, o tratamento com as VEL não reverteu a perda óssea alveolar induzida pela OVX nesses animais, o que discorda de estudos que demonstraram efeitos positivos desses componentes na reversão da depleção de outros sítios. Oliveira e colaboradores (2020) observaram proteção do BMD, BV/TV e Ct.Th do fêmur de animais com osteoporose induzida por OVX durante o mesmo período de tratamento com as VEL e dose terapêutica (OLIVEIRA et al., 2020). Além disso, as VEL, em específico do colostro do leite bovino, também reverteram a perda óssea para BMD e volume ósseo (BV) do fêmur em modelo animal de osteoporose induzida por glicocorticoides em camundongos idosos após 8 semanas de tratamento (YUN et al., 2020). Outro estudo com camundongos OVX submetidos a extração do primeiro molar superior e ao procedimento de osteomia observou que esses animais levaram maior tempo para recuperação óssea dos alvéolos de extração quando comparados ao grupo não ovariectomizado, demonstrando que o reparo ósseo maxilar tende a necessitar de maiores intervalos para completa recuperação (LIU et al., 2019a). No nosso caso, foram utilizados 37 dias de tratamento com as VEL para avaliar efeito terapêutico na maxila dos camundongos. Dessa forma, a diferença de tempo de tratamento e/ou dosagem utilizada pode não ter sido ainda suficiente para induzir modificações ósseas significativas especificamente no osso alveolar.

Para analisar o efeito das VEL na maxila, a mensuração da distância ABC-CEJ foi realizada por meio de micro-CT com intuito de avaliar a reabsorção da crista alveolar. Nossos dados demonstraram aumento acentuado da medida da crista alveolar nos animais OVX não tratados em comparação ao SHAM, indicando maior reabsorção. Semelhante a esse resultado, estudo de Macari e colaboradores (2015) observou aumento acentuado na medida ABC-CEJ de camundongos após a OVX, que, ao serem tratados com estrogênio, foram protegidos da perda óssea alveolar (MACARI et al., 2015). No nosso, estudo, o grupo de camundongos OVX foram tratados com as VEL e apresentaram uma menor altura dessa crista, demonstrando possível efeito protetor desses componentes, quando comparado aos animais OVX controle. A utilização das VEL como tratamento para reversão da perda óssea está

descrita com efeitos positivos em sítios ósseos como o fêmur (OLIVEIRA et al., 2020; YUN et al., 2020) e na modulação de células ósseas *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2016, 2017). Estudos que avaliem o efeito desses componentes no osso maxilar ainda são, até onde sabemos, inexistentes. Com isso, diante dos dados encontrados pela avaliação ABC-CEJ sugere-se que as VEL possam possuir propriedades de modular localmente a reabsorção óssea pelo fato dos animais ingerirem as VEL na água de beber, como observado na manutenção da crista alveolar de camundongos OVX tratados. Contudo, tal mecanismo necessita ser mais bem esclarecido.

A análise das raízes do primeiro molar dos camundongos foi realizada como avaliação complementar do efeito das VEL. A microarquitetura óssea das raízes dentárias (disto-vestibular, palatina e mesio-vestibular) avaliadas por micro-CT não demonstrou diferenças significativas entre os grupos, exceto para os camundongos OVX controle, no qual apresentaram o RV/TV da raiz disto-vestibular reduzido em relação a seu controle SHAM, o que não foi observado entre os grupos tratados com as VEL. Esses resultados corroboram com os dados apresentados em estudo que avaliou a influência da deficiência de estrogênio por OVX na estrutura das raízes dentárias dos camundongos, ao demonstrar redução de volume radicular após o procedimento cirúrgico (AMARO et al., 2020). Sendo assim, sugere-se que as VEL possuem capacidade de atuar localmente, como evidenciado pelo seu efeito na superfície radicular da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior dos camundongos.

Além dos efeitos já citados das VEL no metabolismo ósseo, a influência desses componentes também foi avaliada durante a reabsorção óssea induzida por aparelho ortodôntico. De acordo com nossos dados, a OTM demonstrou maior movimentação dentária nos camundongos OVX controle quando comparados ao grupo SHAM. Esses resultados concordam com estudos que observaram reabsorção óssea significativa durante a OTM em ratos e camundongos OVX quando comparados ao grupo controle (DAI et al., 2017; HASHIMOTO et al., 2013; MACARI et al., 2018). Além disso, em estudo com camundongos deficientes para o receptor de estrogênio, submetidos a OTM, também foi observado maior perda óssea alveolar nos animais, em função do aumento da atividade de osteoclastos e redução de osteoblastos (MACARI et al.,

2016). No nosso estudo, durante a OTM, observamos que no modelo de osteoporose, tanto os animais SHAM tratados, como OVX tratados, não demonstraram diferenças significativas entre a OTM, o que pode indicar o início de uma alteração de perfil de resposta, apesar de ainda não ter diferenças em relação ao controle.

Após significativa OTM nos animais OVX controle, a análise de parâmetros moleculares da maxila foi realizada. Nossos dados demonstraram que as células ósseas foram responsivas a administração das VEL durante o processo de movimentação dentária induzida. Os osteoblastos são as células responsáveis pela deposição da matriz (KENKRE; BASSETT, 2018). Durante a OTM, os osteoblastos são expressos no lado de tensão, onde atuam formando osso alveolar, como evidenciado em estudo que demonstrou aumento de marcadores dessas células como osteopontina, osteocalcina e actina do músculo alfa liso após a OTM (HOLLAND; BAIN; UTREJA, 2019). Na análise histomorfométrica do nosso estudo foi observado redução acentuada dos osteoblastos ao se comparar os animais controles OVX e SHAM. Além disso, demonstrou maior presença dessas células em animais OVX tratados com as VEL em relação aos camundongos OVX controle. A presença de estrogênio contribui para a preservação de osteoblastos ativando mecanismos de autofagia dessas células (DENG; GUO, 2020; GAVALI et al., 2019), o que justifica a redução dessas células nos animais OVX controle. A ação das VEL sobre os osteoblastos foi evidenciada por Oliveira e colaboradores (2016) que observaram aumento da diferenciação de osteoblastos ao tratar células tronco mesenquimais humanas com as VEL *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2016). Em camundongos OVX tratados com as VEL também foi observado aumento de osteoblastos no fêmur quando comparados aos animais OVX não tratados (OLIVEIRA et al., 2020), como observado em nosso estudo na maxila. Assim, nossos dados sugerem que as VEL podem influenciar a manutenção dos osteoblastos no osso alveolar de camundongos OVX durante a OTM, favorecendo a formação óssea.

Os osteócitos, células presente na matriz óssea, desempenham importante função na homeostase do tecido (KATSIMBRI, 2017). Nossos resultados demonstraram uma redução no número de osteócitos no grupo de animais controle OVX com OTM, enquanto o grupo tratado com as VEL apresentou maior número

dessas células reguladoras ao se comparar com o grupo OVX não tratado. É importante ressaltar que a sobrevivência de osteócitos está relacionada com a presença do estrogênio (FLORENCIO-SILVA et al., 2018). Animais com deficiência do hormônio gonadal, como os animais OVX, possuem maiores taxas de apoptose de osteócitos, o que pode favorecer a sinalização celular para produção de RANKL e ativação de osteoclastos (FLORENCIO-SILVA et al., 2018; KENNEDY et al., 2014; YE et al., 2017). Em estudo com animais OVX foi observado aumento da apoptose de osteócitos com diminuição da BMD do fêmur e agravamento da lesão periapical induzida nos primeiros molares maxilar e mandibular de ratos em comparação ao grupo SHAM (SILVA et al., 2020). Sendo assim, a diminuição de osteócitos nos animais OVX possivelmente contribuiu com o aumento da perda óssea alveolar. É importante ressaltar que a atividade dos osteócitos está fortemente relacionada com a secreção de moléculas como a esclerostina, proteína que atua como marcador de maturação da célula (HAN et al., 2018; KAPOOR et al., 2014). Nos animais tratados com as VEL foi observado aumento da expressão de esclerostina na maxila, que pode estar relacionada a presença abundante de osteócitos nesses camundongos em relação aos animais OVX controle. Oliveira e colaboradores (2016) demonstraram resultados semelhantes em pesquisa com cultura de células mesenquimais humanas tratadas com VEL. Nos resultados apresentados, a administração das VEL aumentou a diferenciação de osteócitos *in vitro* assim como a produção de esclerostina (OLIVEIRA et al., 2016). Além disso, foi demonstrado um aumento no número de osteócitos e esclerostina também no fêmur de camundongos OVX tratados com as VEL (OLIVEIRA et al., 2020). Sendo assim, esses dados sugerem que as VEL possuem capacidade de modular a maturação de osteócitos durante o processo de remodelação.

Por se tratarem de células com função reabsortiva, os osteoclastos possuem grande importância no metabolismo ósseo (KENKRE; BASSETT, 2018). Os camundongos submetidos à cirurgia de OVX e OTM tratados com as VEL apresentaram menor presença de osteoclastos por meio da contagem de células TRAP positivas, quando comparados ao grupo OVX não tratado. Sendo assim, o grupo de animais OVX tratado com as VEL demonstrou susceptibilidade reduzida à

renovação óssea devido a menor presença dessas células durante a OTM. É importante ressaltar que a atividade de osteoclastos é dependente da ativação do seu receptor RANK com o ligante RANKL. Concomitante ao aumento significativo de osteoclastos, a análise maxilar evidenciou aumento da proporção RANKL/OPG nos camundongos OVX não tratados, sendo que esse tipo de alteração está relacionado com aumento da osteoclastogênese (ONAL et al., 2012; ZHAO et al., 2019). A super ativação de osteoclastos pode levar à perda óssea excessiva, resultando em BMD reduzida e fragilidade óssea. Dai e colaboradores (2014) demonstraram que a indução de osteoporose no osso alveolar de camundongos por OVX foi associada ao aumento da atividade de osteoclastos (DAI et al., 2014), como observado em nossos resultados. Anteriormente, já havia sido demonstrado que o tratamento com as VEL reduziu a presença e diferenciação dos osteoclastos, melhorando parâmetros ósseos do fêmur de camundongos OVX, além de reduzir a relação RANKL/OPG (OLIVEIRA et al., 2020). Então, a modulação negativa de ambos os marcadores pelas VEL, também evidenciada no osso alveolar, revela um possível mecanismo de regulação celular associado à proteção óssea maxilar.

Citocinas inflamatórias também são fatores que aumentam a taxa de renovação óssea e estão associadas ao processo de OTM (FENG; GUO; LI, 2019). Nos grupos OVX independente do tratamento, demonstramos um aumento significativo de TNF. Essa citocina está relacionada com ações pro-inflamatórias e com a promoção da reabsorção óssea por meio da ativação de osteoclastos e supressão de precursores de osteoblastos (OSTA; BENEDETTI; MIOSSEC, 2014; ZHAO, 2017). Estudo em cultura de esplenócitos e células sanguíneas de camundongos transgênicos com super expressão de TNF observou maior indução de osteoclastogênese em comparação com as células de camundongos selvagens (LI et al., 2004). Esses dados sugerem que as ações deletérias do TNF podem contribuir negativamente para a manutenção óssea. Além disso, a deficiência de estrogênio pode levar ao aumento de TNF, como foi observado em estudo em camundongos com deleção do receptor para o hormônio, que, como consequência, apresentaram aumento significativo da citocina concomitante ao aumento de osteoclastos no osso alveolar (MACARI et al., 2016). Por outro lado, a IL-33, membro da família da superfamília da IL-1 e que possui

atividades relacionadas com resposta imunológica Th2 (CATALAN-DIBENE; MCINTYRE; ZLOTNIK, 2018), estava aumentada nos animais OVX não tratados. A IL-33 está relatada na literatura como uma citocina com ações protetoras nos ossos e pode atuar como uma alarmina durante diversas situações metabólicas (DE MARTINIS et al., 2020; OHORI et al., 2020). Contudo, a ação da IL-33 em condições patológicas não é totalmente esclarecida. Macari e colaboradores (2018) demonstraram que a IL-33 está aumentada na maxila de animais OVX, e, após a deleção do seu receptor ST2, os camundongos apresentaram menor perda óssea alveolar associada à deficiência de estrogênio. Então, a super expressão de IL-33 foi associada na maxila de animais operados com o aumento da perda óssea local, como observado em nossos resultados (MACARI et al., 2018). Além disso, estudo com cultura de células demonstrou que a presença de IL-33 aumentou a diferenciação de osteoclastos assim como lacunas de reabsorção óssea em ensaio com discos osteológicos, sendo que a adição de anticorpo para o receptor ST2 suprimiu a reabsorção óssea (MUN et al., 2010). Dessa forma, a redução observada na expressão dessa citocina na maxila dos animais OVX tratados com as VEL pode indicar uma possível influência positiva no tecido, mesmo que ainda se mantenha o estímulo patológico. Assim, a IL-33 aparenta possuir ação bimodal no metabolismo ósseo, variando de acordo com o local e com a condição patológica, como demonstrado em nosso estudo pela deficiência de estrogênio.

Além dos parâmetros avaliados, reabsorção inflamatória radicular induzida por movimentação ortodôntica também foi analisada para averiguar os efeitos das VEL sobre a atividade das células reabsortivas. É importante ressaltar que a uma leve reabsorção radicular, com arredondamento radicular, é considerada consequência da OTM e está associada ao aumento da atividade de odontoclastos, que removem o cimento e a dentina radicular (YASSIR; MCINTYRE; BEARN, 2020). No nosso estudo, durante a OTM foi observado maior presença de lacunas de reabsorção óssea na raiz disto-vestibular dos animais OVX não tratados, como evidenciado pelo aumento significativo de OIIRR. Esses achados corroboram com a maior reabsorção óssea radicular do grupo de camundongos OVX (AMARO et al., 2020; LI et al., 2020), bem como a possível proteção causada pelas VEL. Além disso, a presença de

RANKL, assim como o aumento da proporção RANKL/OPG é um fator relacionado com o aumento da OIIRR (MATSUDA et al., 2017), como foi encontrado em nossos resultados. Portanto, as VEL demonstraram capacidade de modular positivamente a atividade absortiva na raiz dentária dos camundongos OVX, demonstrando como componentes promissores para a manutenção da estrutura radicular, visto que não ocorre reposição tecidual das raízes dentárias como no remodelamento dos ossos.

Sistemicamente, a avaliação de marcadores ósseos apresentou-se maior para RANKL e para relação RANKL/OPG nos animais OVX controle em comparação ao SHAM. Essa redução também foi observada ao se comparar os animais OVX tratados com OVX não tratados. Oliveira e colaboradores (2020) também encontraram redução da relação RANKL/OPG sistêmicos em camundongos tratados com as VEL (OLIVEIRA et al., 2020). A presença de RANKL está relacionada com a osteoclastogênese e aumento da perda óssea no fêmur e tibia, assim como o aumento da relação RANKL/OPG (LI et al., 2018a; LIU et al., 2019b). Além disso, a análise de marcadores de inflamação sistêmica demonstrou presença acentuada de leucócitos totais e células mononucleares nos animais OVX controle em relação aos OVX tratados. De forma complementar, a análise de células polimorfonucleares demonstrou-se aumentada em ambos os grupos OVX. A deficiência de estrogênio está relacionada com a resposta imunológica inata (STUBELIUS et al., 2017). Em estudo que avaliou marcadores inflamatórios após a cirurgia de OVX, foi demonstrado aumento de neutrófilos e monócitos em camundongos ao se comparar com o grupo SHAM (POURAFSHAR et al., 2018). Além da inflamação perpetuada pela OVX, como observado em nossos grupos pelo aumento de células mononucleares, é importante ressaltar que a presença de monócitos pode contribuir para a diferenciação de osteoclastos (PARK et al., 2020). Em nossos dados, camundongos OVX controle apresentaram maior perfil de células mononucleares, além da presença acentuada de RANKL e proporção RANKL/OPG. Esses achados sugerem que o procedimento cirúrgico pode contribuir para a osteoclastogênese. Contudo, a presença das VEL parece regular negativamente a presença de monócitos, podendo estar relacionada com o controle de mediadores inflamatórios e reabsortivos sistêmicos.

## **7 CONCLUSÃO**

Diante dos dados apresentados nesse trabalho, conclui-se que a cirurgia de OVX causou alterações significativas no tecido ósseo maxilar dos camundongos, mimetizando o quadro de osteoporose. Apesar do tratamento dos animais OVX com as VEL não demonstrar eficácia em reverter ou retardar a perda óssea causada pela ovariectomia na maxila, houve uma redução interessante da altura da crista alveolar causada pelo tratamento com as VEL. Contudo, o efeito benéfico na manutenção óssea foi maior ao ser induzido o remodelamento ósseo por meio do OTM, ao apresentar uma modulação positiva na presença das células ósseas no tecido (osteoclastos e osteócitos) e nos marcadores locais e sistêmicos associados ao processo de remodelamento ósseo (RANKL e OPG), assim como a proteção contra a reabsorção radicular inflamatória. Esses dados sugerem que esse componente dietético tem potencial para o tratamento da perda óssea apresentada na maxila, contudo, ainda pode necessário um ajuste de tempo e/ou dose para se observar alguma alteração significativa na estrutura óssea no contexto geral da patologia. Com isso, estudos complementares ainda devem ser realizados para esclarecer os mecanismos associados com a possível ação terapêutica das VEL sobre o tecido ósseo.

## REFERÊNCIAS

- ALRAJHI, M. et al. Maxillary Bone Resorption with Conventional Dentures and Four-Implant–Supported Fixed Prosthesis Opposed by Distal-Extension Partial Dentures: A Preliminary 5-year Retrospective Study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, 2020.
- AMARO, E. R. S. et al. Estrogen protects dental roots from orthodontic-induced inflammatory resorption. **Archives of Oral Biology**, 2020.
- ANAGNOSTIS, P. et al. **New therapeutic targets for osteoporosis** *Maturitas*, 2019.
- ARNTZ, O. J. et al. Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2015.
- ASANO, M. et al. IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. **Oral Diseases**, 2011.
- BALIC, A. **Biology explaining tooth repair and regeneration: A mini-review** *Gerontology*, 2018.
- BALOUL, S. S. Osteoclastogenesis and Osteogenesis during Tooth Movement. **Frontiers of Oral Biology**, 2015.
- BOUXSEIN, M. L. et al. **Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography** *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010.
- BOYCE, B. F. **Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions** *Journal of Dental Research*, 2013.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira Guia Alimentar para a População Brasileira**. [s.l: s.n.].
- BUCK, D. W.; DUMANIAN, G. A. **Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals** *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2012.
- CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. **Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014.
- CATALAN-DIBENE, J.; MCINTYRE, L. L.; ZLOTNIK, A. Interleukin 30 to Interleukin 40. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, 2018.
- CHRISTAKOS, S. et al. Intestinal regulation of calcium: Vitamin D and bone physiology. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.].
- COMPSTON, J. E.; MCCLUNG, M. R.; LESLIE, W. D. **Osteoporosis** *The Lancet*,

2019.

COTTON, D. et al. In the clinic: Osteoporosis. **Annals of Internal Medicine**, 2011.

CUMMINGS, S. R. et al. Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, 2009.

DAI, Q. et al. Force-induced increased osteogenesis enables accelerated orthodontic tooth movement in ovariectomized rats. **Scientific Reports**, 2017.

DAI, Q. G. et al. Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: An in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats. **Oral Diseases**, 2014.

DATTA, H. K. et al. **The cell biology of bone metabolism** **Journal of Clinical Pathology**, 2008.

DE MARTINIS, M. et al. **IL-33/IL-31 axis in osteoporosis** **International Journal of Molecular Sciences**, 2020.

DENG, L.; GUO, Y. Estrogen effects on orthodontic tooth movement and orthodontically-induced root resorption. **Archives of Oral Biology**, v. 118, 2020.

DERVIS, E. Oral implications of osteoporosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, 2005.

DI DOMENICO, M. et al. **Cytokines and VEGF induction in orthodontic movement in animal models** **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

DIRCKX, N. et al. **The role of osteoblasts in energy homeostasis** **Nature Reviews Endocrinology**, 2019.

EGHBALI-FATOURECHI, G. et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. **Journal of Clinical Investigation**, 2003.

ERIKSEN, E. F. **Treatment of osteopenia** **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, 2012.

FARDELLONE, P. **The effect of milk consumption on bone and fracture incidence, an update** **Aging Clinical and Experimental Research**, 2019.

FARR, J. N. et al. Independent Roles of Estrogen Deficiency and Cellular Senescence in the Pathogenesis of Osteoporosis: Evidence in Young Adult Mice and Older Humans. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2019.

FENG, W.; GUO, J.; LI, M. **RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis** **Journal of Oral Biosciences**, 2019.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. **Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis** **Immunity**, 2017.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. **Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells** *BioMed Research International*, 2015.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2018.

FRENCH, D. M. et al. WISP-1 is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. **American Journal of Pathology**, 2004.

GAUR, T. et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.

GAVALI, S. et al. Estrogen enhances human osteoblast survival and function via promotion of autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2019.

HAN, Y. et al. **Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts** *Bone Research*, 2018.

HARVEY, N. C. et al. **The role of calcium supplementation in healthy musculoskeletal ageing: An expert consensus meeting of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) and the International Foundat** *Osteoporosis International*, 2017.

HASHIMOTO, M. et al. The effect of bone morphometric changes on orthodontic tooth movement in an osteoporotic animal model. **Angle Orthodontist**, 2013.

HEMMATIAN, H. et al. **Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction** *Current Osteoporosis Reports*, 2017.

HENRIKSEN, K. et al. **Local communication on and within bone controls bone remodeling** *Bone*, 2009.

HERWIJNEN, M. J. C. VA. et al. Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. **Frontiers in Nutrition**, 2018.

HOLLAND, R.; BAIN, C.; UTREJA, A. Osteoblast differentiation during orthodontic tooth movement. **Orthodontics and Craniofacial Research**, 2019.

HUANG, X. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. **BMC Genomics**, 2013.

HURLEY, J. H.; ODORIZZI, G. **Get on the exosome bus with ALIX** *Nature Cell Biology*, 2012.

IZUMI, H. et al. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. **Journal of Dairy Science**, 2012.

JILKA, R. L. **Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH** *Bone*, 2007.

KAPOOR, P. et al. **Effect of orthodontic forces on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid: A systematic review** *Progress in Orthodontics*, 2014.

KATSIMBRI, P. **The biology of normal bone remodelling** *European Journal of Cancer Care*, 2017.

KEARNS, A. E.; KHOSLA, S.; KOSTENUIK, P. J. **Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease** *Endocrine Reviews*, 2008.

KENKRE, J. S.; BASSETT, J. H. D. **The bone remodelling cycle** *Annals of Clinical Biochemistry*, 2018.

KENNEDY, O. D. et al. Osteocyte apoptosis is required for production of osteoclastogenic signals following bone fatigue in vivo. **Bone**, 2014.

KHOSLA, S. **Minireview: The OPG/RANKL/RANK system** *Endocrinology*, 2001.

KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. **Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges** *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 2017.

KHOSLA, S.; MONROE, D. G. **Regulation of bone metabolism by sex steroids** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2018.

KHUNDMIRI, S. J.; MURRAY, R. D.; LEDERER, E. PTH and vitamin D. **Comprehensive Physiology**, 2016.

KRIBBS, P. J. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, 1990.

KRUGER, M. C. et al. Calcium and vitamin D fortified milk reduces bone turnover and improves bone density in postmenopausal women over 1 year. **European Journal of Nutrition**, 2018.

LÄSSER, C. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages. **Journal of Translational Medicine**, 2011.

LI, F. et al. A new vaccine targeting RANKL, prepared by incorporation of an unnatural Amino acid into RANKL, prevents OVX-induced bone loss in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2018a.

LI, K. et al. **The good, the bad, and the ugly of calcium supplementation: A review of calcium intake on human health** *Clinical Interventions in Aging*, 2018b.

LI, P. et al. Systemic Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Mediates an Increase in Peripheral CD11b<sup>high</sup> Osteoclast Precursors in Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Transgenic Mice. **Arthritis and Rheumatism**, 2004.

LI, T. et al. Effects of estrogen on root repair after orthodontically induced root resorption in ovariectomized rats. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 2020.

LI, Y. et al. **Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications** *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2018c.

LI, Z. et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, 2009.

LIN, C. et al. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2009.

LIU, Y. et al. WNT3A accelerates delayed alveolar bone repair in ovariectomized mice. **Osteoporosis International**, 2019a.

LIU, Y. et al. Loureirin B suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomized osteoporosis via attenuating NFATc1 and ROS activities. **Theranostics**, 2019b.

LUUKKONEN, J. et al. Osteoclasts secrete osteopontin into resorption lacunae during bone resorption. **Histochemistry and Cell Biology**, 2019.

MACARI, S. et al. Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. **Archives of Oral Biology**, 2015.

MACARI, S. et al. Osteoprotective effects of estrogen in the maxillary bone depend on ER $\alpha$ . **Journal of Dental Research**, 2016.

MACARI, S. et al. ST2 regulates bone loss in a site-dependent and estrogen-dependent manner. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2018.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis\*. **Endocrine Reviews**, 2000.

MAO, Y. et al. Tension force-induced bone formation in orthodontic tooth movement via modulation of the GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathway. **Journal of Molecular Histology**, 2018.

MARTIN, J. T. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. **World Journal of Orthopaedics**, 2013.

MATÍA-MARTÍN, P. et al. **Effects of Milk and Dairy Products on the Prevention of Osteoporosis and Osteoporotic Fractures in Europeans and Non-Hispanic Whites from North America: A Systematic Review and Updated Meta-Analysis***Advances in Nutrition*, 2019.

MATSUDA, Y. et al. RANKL and OPG expression: Jiggling force affects root resorption in rats. **Angle Orthodontist**, 2017.

MORGAN, E. F.; UNNIKRISSAN, G. U.; HUSSEIN, A. I. **Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States***Annual Review of Biomedical Engineering*, 2018.

MUN, S. H. et al. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14+ monocytes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2010.

NICOPOULOU-KARAYIANNI, K. et al. Tooth loss and osteoporosis: The osteodent study. **Journal of Clinical Periodontology**, 2009.

OHORI, F. et al. IL-33 inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis and bone resorption. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020.

OLIVEIRA, M. C. et al. Milk extracellular vesicles accelerate osteoblastogenesis but impair bone matrix formation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2016.

OLIVEIRA, M. C. et al. Milk-Derived Nanoparticle Fraction Promotes the Formation of Small Osteoclasts But Reduces Bone Resorption. **Journal of Cellular Physiology**, 2017.

OLIVEIRA, M. C. et al. Bovine Milk Extracellular Vesicles Are Osteoprotective by Increasing Osteocyte Numbers and Targeting RANKL/OPG System in Experimental Models of Bone Loss. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020.

ONAL, M. et al. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. **Journal of Biological Chemistry**, 2012.

OSTA, B.; BENEDETTI, G.; MIOSSEC, P. **Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis***Frontiers in Immunology*, 2014.

PARK, E. et al. Scopolin attenuates osteoporotic bone loss in ovariectomized mice. **Nutrients**, 2020.

PIETERS, B. C. H. et al. Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF- $\beta$ . **PLoS ONE**, 2015.

PINHEIRO, M. DE M.; EIS, S. R. **Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: What we have and what we need***Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 2010.

PINHEIRO, M. M. et al. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. **Revista de Saude Publica**, 2010.

PLOTKIN, L. I.; BELLIDO, T. **Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility** *Nature Reviews Endocrinology*, 2016.

PORTO, O. C. L. et al. CBCT assessment of bone thickness in maxillary and mandibular teeth: An anatomic study. **Journal of Applied Oral Science**, 2020.

POURAFSHAR, S. et al. The effects of supplemental Vitamin E on hematological parameters in a rat model of ovarian hormone deficiency. **Menopause**, 2018.

PRIDEAUX, M.; FINDLAY, D. M.; ATKINS, G. J. **Osteocytes: The master cells in bone remodelling** *Current Opinion in Pharmacology*, 2016.

RADAVELLI-BAGATINI, S. et al. Dairy food intake, peripheral bone structure, and muscle mass in elderly ambulatory women. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2014.

RADOMINSKI, S. C. et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2017.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. **Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends** *Journal of Cell Biology*, 2013.

ROBLING, A. G. et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. **Journal of Biological Chemistry**, 2008.

RUNYAN, C. M.; GABRICK, K. S. Biology of bone formation, fracture healing, and distraction osteogenesis. **Journal of Craniofacial Surgery**, 2017.

RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.-O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. **Medical Science Monitor Basic Research**, 2016.

SALVA, J. E.; MERRILL, A. E. **Signaling networks in joint development** *Developmental Dynamics*, 2017.

SHOJI-MATSUNAGA, A. et al. Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression. **Scientific Reports**, 2017.

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. **Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement** *Physiology*, 2016.

SILVA, R. A. B. et al. Alendronate inhibits osteocyte apoptosis and inflammation via IL-6, inhibiting bone resorption in periapical lesions of ovariectomized rats. **International Endodontic Journal**, 2020.

SIRISOONTORN, I. et al. Tooth movement and root resorption; The effect of

- ovariectomy on orthodontic force application in rats. **Angle Orthodontist**, 2011.
- SONG, C. et al. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW264.7 cells. **Journal of Cellular Physiology**, 2019.
- STUBELIUS, A. et al. Ovarian hormones in innate inflammation. **Immunobiology**, 2017.
- SUKREET, S. et al. Identification of Glycoproteins on the Surface of Cow's Milk Exosomes that Mediate the Uptake of Exosomes into Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells. **The FASEB Journal**, 2016.
- TAKAYANAGI, H. **Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems** *Nature Reviews Immunology*, 2007.
- THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. **Exosomes: Composition, biogenesis and function** *Nature Reviews Immunology*, 2002.
- TOUNTA, T. S. Diagnosis of osteoporosis in dental patients. **Journal of Frailty, Sarcopenia and Falls**, 2017.
- TU, X. et al. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. **Bone**, 2012.
- VARGAS-SANCHEZ, P. K. et al. Osteoporosis Affects Functional Activity and Gene Expression of Osteoblastic Cells Derived from Rat Alveolar Bone. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, n. 6, p. 617–622, 2020.
- VOGEL, K. A. et al. The effect of dairy intake on bone mass and body composition in early pubertal girls and boys: A randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2017.
- WACTAWSKI-WENDE, J. **Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms.** *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, 2001.
- WANG, C. W. (JEFF); MCCAULEY, L. K. **Osteoporosis and Periodontitis** *Current Osteoporosis Reports*, 2016.
- WATSON, S. L. et al. High-Intensity Resistance and Impact Training Improves Bone Mineral Density and Physical Function in Postmenopausal Women With Osteopenia and Osteoporosis: The LIFTMOR Randomized Controlled Trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2018.
- WELTMAN, B. et al. Root resorption associated with orthodontic tooth movement: A systematic review. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 2010.

WILLIAMSON, L. et al. High dose dietary vitamin D3 increases bone mass and strength in mice. **Bone Reports**, 2017.

WOLF, T.; BAIER, S. R.; ZEMPLIENI, J. The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells<sup>1-3</sup>. **Journal of Nutrition**, 2015.

XIAO, W. et al. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. **Frontiers of Oral Biology**, 2015.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions****Journal of Extracellular Vesicles**, 2015.

YASSIR, Y. A.; MCINTYRE, G. T.; BEARN, D. R. Orthodontic treatment and root resorption: an overview of systematic reviews. **European Journal of Orthodontics**, 2020.

YE, T. et al. Protective effect of low-dose risedronate against osteocyte apoptosis and bone loss in ovariectomized rats. **PLoS ONE**, 2017.

YUN, B. et al. Short communication: Dietary bovine milk–derived exosomes improve bone health in an osteoporosis-induced mouse model. **Journal of Dairy Science**, 2020.

ZANCHETTA, J. The Latin America regional Audit: epidemiología, costos e impacto de la osteoporosis en 2012. **International Osteoporosis Foundation.**, 2012.

ZEMPLIENI, J. et al. Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants. **Journal of Nutrition**, 2017.

ZEMPLIENI, J. et al. **Milk-Derived Exosomes and Metabolic Regulation****Annual Review of Animal Biosciences**, 2019.

ZHAO, B. **TNF and Bone Remodeling****Current Osteoporosis Reports**, 2017.

ZHAO, J. et al. MiR-146a Deletion Protects From Bone Loss in OVX Mice by Suppressing RANKL/OPG and M-CSF in Bone Microenvironment. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2019.

ZHAO, J. G. et al. **Association between calcium or Vitamin D supplementation and fracture incidence in community-dwelling older adults a systematic review and meta-analysis****JAMA - Journal of the American Medical Association**, 2017.

ZHOU, Q. et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. **International Journal of Biological Sciences**, 2011.

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da administração oral de vesículas extracelulares do leite no tecido ósseo", protocolo do CEUA: 2/2017 sob a responsabilidade de Adaliene Versiani Matos Ferreira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/04/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	07/03/2017 a 07/03/2020
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/bl
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/bl
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/bl
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/bl
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/bl
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 8(semanas)